

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh)

Ergothioneingehalt und seine Relation zum GSH-Gehalt im menschlichen Erythrocyten

(Untersuchungen bei hereditärer Sphärocytose, Glukose-6-Phosphat-
Dehydrogenasemangel, Cystinose und Leukämie)

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Brigitte Krommes
aus Mallersdorf/Ndb.

1974

Marburg 1973

Aus der Universitäts-Kinderklinik Marburg an der Lahn
(Direktor: Prof. Dr. F. Linneweh)

Ergothioneingehalt und seine Relation zum GSH-Gehalt im menschlichen Erythrocyten

(Untersuchungen bei hereditärer Sphärocytose, Glukose-6-Phosphat-
Dehydrogenasemangel, Cystinose und Leukämie)

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg



vorgelegt von
Brigitte Krommes
aus Mallersdorf/Ndb.

Marburg 1973



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 10.5. 1974
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Dekan: Prof.Dr.H.Oepen
Referent: Prof.Dr.F. Linneweh
Correferent: Prof.Dr.C. Sekeris

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

in the center of the page



at the bottom of the page

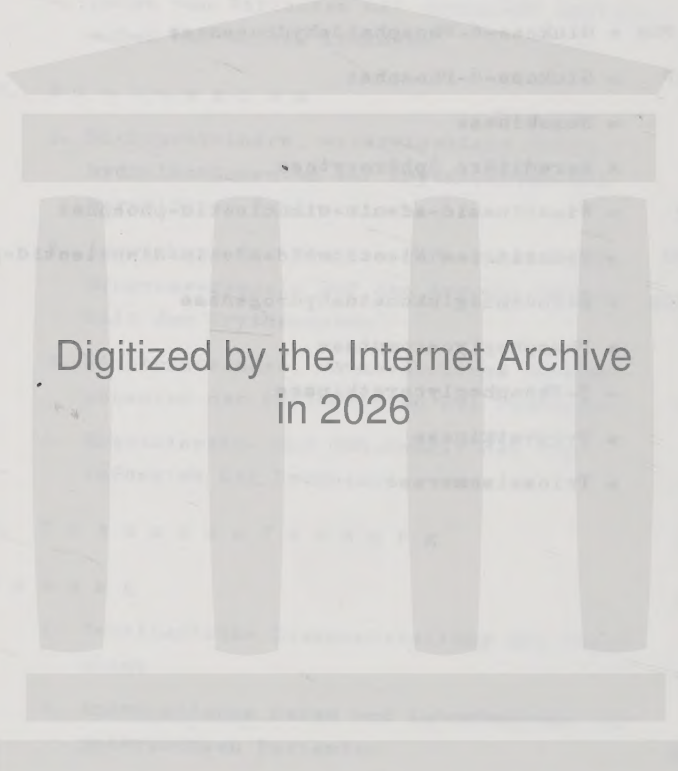
Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung	S. 1
B. Literatur	S. 2
1. Ergothionein	S. 2
a) Geschichtliches und Vorkommen	S. 2
b) Chemie	S. 2
c) Synthese und Abbau	S. 3
d) Physiologische Bedeutung	S. 5
e) Bisherige Bestimmungen in menschlichen Erythrocyten	S. 6
2. Bedeutung der wasserlöslichen SH-Gruppen für den Stoffwechsel der Erythrocyten	S. 8
3. Hereditäre Sphärocytose	S.12
4. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel	S.15
5. Cystinose	S.17
6. Leukämie	S.20
C. Eigene Fragestellung	S.23
D. Material und Methoden	S.26
1. Reagentien	S.26
2. Lösungen	S.27
3. Meßmethodik	S.29
a) Herstellung der Erythrocytensuspension für die Ergothionein- und GSH-Bestimmung	S.29
b) Bestimmung des Ergothioneingehalts	S.29
c) Bestimmung des GSH-Gehalts	S.31
4. Statistische Sicherung der Versuchsergebnisse	S.34
E. Ergebnisse	S.35
1. Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bei hereditärer Sphärocytose	S.35

2. Ergothioneingehalt und seine Relation zum GSH-Gehalt in Erythrocyten mit G-6-PDH-Mangel	S.39
3. Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bei Cystinose	S.44
4. Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten von Patienten mit chronisch myeloiden und akuten Leukosen	S.49
F. D i s k u s s i o n	S.54
1. Nichtproteinäre, wasserlösliche Sulfhydrilkomponenten der Erythrocyten bei hereditärer Sphärocytose	S.54
2. Auswirkung des Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangels auf den Ergothioneingehalt der Erythrocyten	S.56
3. Nichtproteinäre, wasserlösliche SH-Komponenten der Erythrocyten bei Cystinose	S.58
4. Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bei Leukosen	S.60
G. Z u s a m m e n f a s s u n g	S.63
A n h a n g	S.65
1. Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse	S.65
2. Anamnestiche Daten und Laborbefunde der untersuchten Patienten	S.70
L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	

B e n u t z t e A b k ü r z u n g e n

GSH	=	reduziertes Glutathion
GSSG	=	oxydiertes Glutathion
GSR	=	Glutathion-Reduktase
G-6-PDH	=	Glukose-6-Phosphatdehydrogenase
G-6-P	=	Glukose-6-Phosphat
HK	=	Hexokinase
HS	=	hereditäre Sphärocytose
NADP	=	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	=	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
6-PGDH	=	6-Phosphoglukonatdehydrogenase
PGM	=	Phosphoglyceromutase
PGK	=	3-Phosphoglyceratkinase
PK	=	Pyruvatkinase
TIM	=	Trioseisomerase



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A. Einleitung

Ergothionein wurde 1928 in den menschlichen Erythrocyten entdeckt (55) und zählt als das Betainderivat des Thiohistidins ebenso wie Glutathion zu den wasserlöslichen Sulfhydrylkomponenten der Erythrocyten. Die Bedeutung dieser Komponenten für die Erythrocyten liegt im Schutz vor Oxydation und damit in der Erhaltung der Integrität dieser Zellen (97).

Die SH-Gruppen dieser Substanzen sind befähigt, die für die Überlebenszeit der Erythrocyten bedeutsamen Thiolgruppen, wie sie sich u.a. in der Membran, dem Hämoglobin und vielen Enzymen finden, in ihrem reduzierten Zustand zu erhalten. Dabei fangen sie entweder oxydierende Agentien, wie sie in den Erythrocyten entstehen können, ab oder reduzieren die schon oxydierten Thiolgruppen als Redoxpartner zurück, wobei sie selbst in das Disulfid übergehen.

Bisher beschäftigten sich allerdings die meisten Arbeiten nur mit dem Glutathion, dessen genauere Funktion im Erythrocytenstoffwechsel weitgehend aufgeklärt ist. Über das Ergothionein liegen kaum Ergebnisse vor. Ein klares Bild besteht bisher lediglich über seinen normalen Gehalt in den menschlichen Erythrocyten in den verschiedenen Altersstufen (39, 111, 127). Über den Ergothioneingehalt bei Erkrankungen liegen nur wenige Arbeiten vor. Dessen Kenntnis könnte jedoch wichtige Hinweise auf die genauere biochemische Bedeutung des Ergothioneins und seinen Metabolismus innerhalb der Erythrocyten erbringen.

In dieser Arbeit wurde deshalb der Ergothioneingehalt der Erythrocyten bei Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel, hereditärer Sphärocytose, Cystinose und Leukämie untersucht. Gleichzeitig bestimmten wir jeweils den Gehalt an reduziertem Glutathion und berechneten die prozentuale Beziehung zwischen den beiden SH-haltigen Komponenten.

B. Literatur und Problemstellung

1. Ergothionein

a) Geschichtliches und Vorkommen

Ergothionein, eine bis dahin unbekannte Substanz, wurde 1909 erstmals von Tanret aus dem Mutterkorn, einer Pilzinfektion des Roggens, isoliert (124). Eagles und Hunter konnten sie 1925 (34), Benedict u.a. 1926 (10) unabhängig voneinander in den Erythrocyten des Schweines nachweisen. Nachdem Hunter 1928 eine spezifische Nachweismethode für Ergothionein entwickelt hatte, konnte er zeigen, daß Ergothionein ein normaler Bestandteil der Erythrocyten der verschiedensten Säugetiere und auch des Menschen ist (55). Daneben wurde es auch in zahlreichen anderen Geweben gefunden, wobei jeweils unterschiedliche, aber für die einzelnen Gewebe charakteristische Konzentrationen bestimmt wurden (89).

b) Chemie

Der chemische Aufbau wurde 1911 von Barger und Ewins aufgeklärt (5). Ergothionein hat die Summenformel $C_9H_{15}O_2N_3S$ und stellt das Betainderivat des Thiolhistidins dar. Damit zählt es ebenso wie Glutathion zu den wasserlöslichen, SH-Gruppen enthaltenden Substanzen der Erythrocyten.

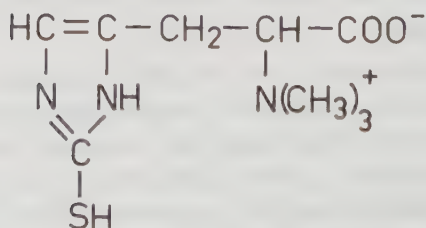


Abb. 1 Strukturformel von Ergothionein

Durch Oxydation mit H_2O_2 entsteht bei physiologischem pH langsam, bei pH 2 sehr rasch das Disulfid (54). Durch Glutathion und Cystein kann Ergothioneindisulfid wieder zu Ergothionein reduziert werden. Dabei werden auch gemischte Disulfide zwischen Ergothionein und Cystein oder Glutathion beobachtet. Ergothioneindisulfid ist in wässrigen Lösungen bei physiologischem pH relativ instabil - das Gleichgewicht zwischen Ergothionein in seiner oxydierten und reduzierten Form liegt deshalb dort auf seiten der reduzierten Form (54). Das Redoxpotential wurde von Rykian mit 0,36 Volt bestimmt (108).

c) Synthese und Abbau

Der Syntheseweg von Ergothionein im menschlichen Organismus ist bisher ebenso wie der Ort der Synthese noch nicht aufgeklärt. Bis 1961 bestand die Ansicht, Ergothionein könne von höheren Organismen nicht synthetisiert werden und werde nur passiv mit der Nahrung aufgenommen (90). Wolf konnte 1961 mit radioaktiv markierten Vorstufen zeigen, daß der Syntheseschritt von Hercynin zu Ergothionein auch bei Ratten möglich ist (133). Askari und Melville beschrieben 1962 den Syntheseweg von Ergothionein bei *Neurospora crassa* (4): Ergothionein wird dort aus Histidin, Methionin und Cystein aufgebaut. Aus L-Histidin wird zunächst durch Methylierung der α -Aminogruppe Hercynin gebildet, die Methylgruppen gehen dabei durch einen Transmethylierungsprozeß von Methionin auf Histidin über. Hercynin wird durch Addition eines Schwefelatoms, das sehr wahrscheinlich von Cystein geliefert wird, zu Ergothionein umgewandelt (Abb.2). Versuche, mit radioaktiv markiertem Methionin und Histidin auch die Synthese von Hercynin bei höheren Lebewesen nachzuweisen, scheiterten jedoch bislang (133, 88, 92).

Die Membran der Erythrocyten ist für Ergothionein relativ undurchlässig. Heath inkubierte menschliches Blut mit Ergothioneinzusatz und konnte nach 4 Stunden noch keinen Übergang aus dem Plasma in die Zellen nachweisen (52). Inji-

ziertes markiertes Ergothionein findet sich erst nach drei bis sechs Tagen in Spuren in den Erythrocyten (90). Damit muß es entweder von den Erythrocyten selbst synthetisiert werden, oder die Einlagerung findet nur während der Erythropoese statt. Im Plasma konnte bisher noch kein Ergothionein nachgewiesen werden (90, 36).

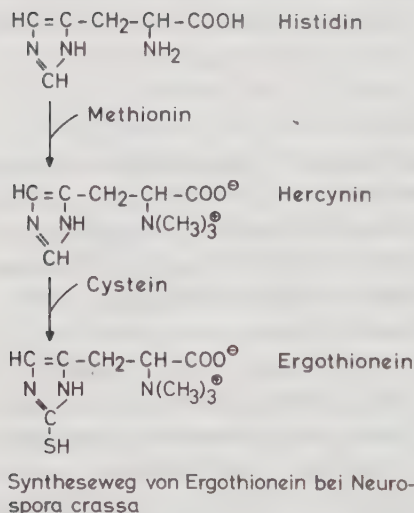


Abb. 2 Syntheseweg von Ergothionein bei *Neurospora crassa* (nach Askari und Melville (4))

Wie Stoffwechseluntersuchungen mit radioaktiv markiertem Ergothionein bei Ratten ergaben, findet der Ergothioneinabbau vorwiegend in der Leber statt (133). Der größte Teil von injiziertem Ergothionein wird dort angesammelt, zu Hercynin abgebaut und als solches mit dem Urin ausgeschieden (133). Der wichtigste Schritt im Abbau scheint damit die Abspaltung der Thiolgruppe zu sein. Dies bestätigt auch

eine Untersuchung von Heath (53), der Ratten S^{35} markiertes Ergothionein injizierte und 35 % der gesamten Radioaktivität im Urin als Sulfat fand. Ein kleiner Anteil des Ergothioneins wird jedoch wahrscheinlich noch weiter abgebaut: 2 - 6 % der Radioaktivität von injiziertem ($\alpha^{14}\text{-C}$) Ergothionein fand Wolf in Leberproteinhydrolysaten, und zwar in Histidin, Arginin, Glutamin- und Asparaginsäure (133). Damit unterscheidet sich der Ergothioneinabbau der Säugetiere offenbar von dem bei Bakterien gefundenen Abbauweg: *E. coli* spaltet in einer enzymatischen, irreversiblen Reaktion Ergothionein in Trimethylamin und Thiourocansäure. Das dazu notwendige Enzym Ergothionase wird nur nach Induktion mit Ergothionein gefunden und zeigt eine hohe Substratspezifität (132). In zellfreien Extrakten von *Alcaligenes faecalis* erscheinen durch hydrolytische Spaltung der Thiourocansäure als weitere Abbauprodukte Ammoniak, H_2S und Glutaminsäure (19).

d) Physiologische Bedeutung

Die physiologische Bedeutung von Ergothionein, insbesondere seine biochemische Funktion im Stoffwechsel der Erythrocyten, ist bisher noch nicht geklärt. Es liegen nur Einzelbefunde vor, die Hinweise auf seine Funktion geben. St. Garay fand 1956, daß eine äquivalente Menge Ergothionein die hemmende Wirkung von H_2O_2 auf die Keimung der Mutterkornkonidien verhindert (41). Mann und Leone konnten zeigen, daß Ergothionein, das auch normalerweise in der Samenflüssigkeit gefunden wird, dort den hemmenden Einfluß von sulfhydrylbindenden Agentien auf die Spermienbeweglichkeit und Fruktolyse herabsetzt (83). Spicer berichtet, daß in Erythrocyten mit niedrigem Ergothioneingehalt bei Nitritzusatz wesentlich schneller Methämoglobin gebildet wird als in Erythrocyten mit höheren Spiegeln (117).

Klebanoff fand 1962, daß Ergothionein eine stark stimulierende Wirkung auf die Reduktion von MetHb zu Hb durch reduzierte Pyridinnucleotide besitzt (68). Koj und Frendo

wiesen in In-vitro-Versuchen nach, daß die Bildung von Sulf-Hämoglobin, das im Blut von Patienten nach längerer Gabe von einigen Drogen, wie z.B. Phenacetin, entstehen kann, durch den Zusatz von Ergothionein vermindert wird. Denselben Effekt zeigten Glutathion und Cystein (70).

Mills ging 1959 der Frage nach, ob Ergothionein das Glutathion in der Glutathionperoxydasereaktion als H_2 -Donator ersetzen kann. Dabei konnte in dem System, das Ascorbinsäure, Hämoglobin und Glutathionperoxydase enthielt, durch den Zusatz von Ergothionein nur eine geringe Abnahme des oxydativen Abbaus des Hämoglobins nachgewiesen werden. GSH bewirkte eine wesentlich größere Hemmung der Choleglobinbildung (94). Klebanoff berichtete 1961 über eine rasche Oxydation von Ergothionein zu Ergothioneindisulfid in einem System (pH 7), das H_2O_2 , eine Peroxydase und Thyroxin oder Oestradiol enthält (69).

Bisher ist die physiologische Bedeutung dieser In-vitro-Effekte noch unbekannt. Es ergibt sich lediglich die Vermutung, daß Ergothionein als ein Redoxsystem innerhalb der Erythrocyten fungieren könne und damit an der Schutzfunktion der löslichen, Sulfhydrylgruppen enthaltenden Substanzen für den Stoffwechsel der Erythrocyten beteiligt sei.

e) Bisherige Bestimmungen in menschlichen Erythrocyten

Den normalen Gehalt der Erythrocyten an Ergothionein untersuchten u.a. Latner 1948 (75), Fraser und Edmonton 1950 (37), Touster 1952 (127), Sawiniec und Szunilo 1968 (111) und kürzlich Fues (39), wobei mit verschiedenen Methoden unterschiedliche Werte gefunden wurden. Die von Fues mit einer modifizierten Methode nach Hunter bestimmten Werte zeigen dabei eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sawiniec: Erwachsene weisen höhere Werte als Kinder, Neugeborene und Frühgeborene auf. Daneben konnte in Retikuloocyten ein höherer Ergothioneingehalt als in alternden Erythrocyten nachgewiesen werden (39).

Fraser und Edmonton konnten 1950 eine Erhöhung des Erythrocytenergothioneingehalts bei Diabetikern feststellen (37). Touster zeigte, daß Schwangerschaft und maligne Erkrankungen den Gehalt nicht beeinflussen (127). Daneben wurde von Fraser und Edmonton 1951 ein großes unausgewähltes Kollektiv von Patienten mit den verschiedensten Erkrankungen untersucht (36). Danach ist bei Tuberkulose, blutenden Magenulcera, akuter Appendicitis, Osteomyelitis, hypochromer und hypoplastischer Anämie, chronischer Bronchitis u.a. der Ergothioneingehalt erhöht, bei Hypothyreose erniedrigt. Dabei liegen seine an einem Normalkollektiv gewonnenen Werte wesentlich höher, als sie kürzlich mit verbesserten Methoden bestimmt wurden (111, 39).

2. Bedeutung der wasserlöslichen SH-Gruppen für den Stoffwechsel der Erythrocyten

Zu den wasserlöslichen, nichtproteinären SH-Komponenten der Erythrocyten zählen Glutathion, Ergothionein und Cystein. Infolge der leichten und reversiblen Oxydierbarkeit ihrer Thiolgruppen stellen sie Redoxsysteme mit einem definiertem Redoxpotential dar (108). Dabei ist Glutathion die quantitativ bedeutsamste dieser Substanzen und kann deshalb als Repräsentant dieser Gruppe angesehen werden. Hereditäre Störungen im Glutathionstoffwechsel (G-6-PDH-Mangel, Glutathionperoxydasmangel, Glutathionreduktasemangel, Störung der Glutathionsynthese) wiesen zunächst auf die Bedeutung der SH-Gruppen für die Erhaltung der Integrität der Erythrocyten hin. Die genannten Störungen führen - meist allerdings erst bei Einwirkung bestimmter Drogen - zu hämolytischen Anämien mit Ikterus, Retikulozytose und Innenkörperbildung (18, 23, 81, 96, 130). Gemeinsam ist ihnen der Mangel oder die Instabilität an reduziertem Glutathion.

Cohen und Hochstein zeigten 1964, daß bei Inkubation der Erythrocyten mit vielen Drogen H_2O_2 gebildet wird (26). Dieses kann durch GSH unter Katalyse der Glutathionperoxydase zu H_2O reduziert werden, wobei GSH selbst zum Disulfid oxydiert wird (93, 94). Das Disulfid GSSG wird anschließend durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase wieder zu GSH reduziert (Abb. 3). Durch diese rasche Umwandlung von H_2O_2 zu H_2O schützt GSH die Erythrocyten vor oxydativer Schädigung.

Darüber hinaus besitzt es noch eine allgemeinere Bedeutung in der Umwandlung oxydierender Agentien innerhalb der Erythrocyten. Kosower zeigte 1969, daß auch freie Radikale innerhalb der Zellen durch nichtenzymatische Reaktionen schnell durch GSH inaktiviert werden (73). GSH wird dabei teils zu GSSG oxydiert, teils kommt es zu einer reversiblen gemischten Disulfidbindung zwischen Glutathion und anderen Thiolgruppen, die dadurch vor irreversibler Oxydation geschützt werden (2, 35).

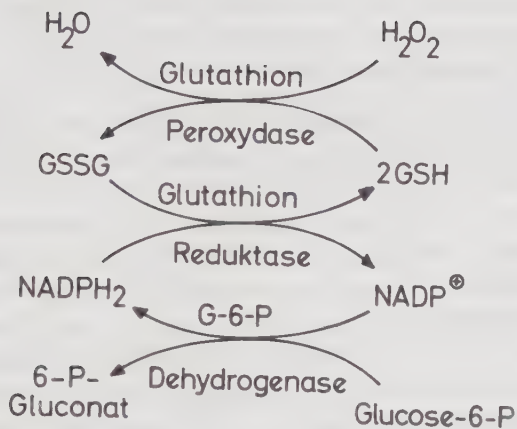


Abb. 3: Reaktionsschema der Reduktion von H_2O_2 durch GSH und dessen Rückgewinnung aus dem dadurch entstandenen GSSG (nach Rietkötter (103)).

Solche für die Überlebenszeit der Erythrocyten bedeutsame Thiolgruppen finden sich u.a. im Hämoglobin, in der Erythrocytenmembran und bestimmten Enzymen.

Oxydation oder Blockade von mehr als zwei Sulfhydrylgruppen des Hämoglobins führen zu schneller irreversiblen Präzipitation des Hb in Heinz-Innenkörper und vorzeitiger Zerstörung der Erythrocyten im reticulo-endothelialen System (2). Elektronenmikroskopische Studien ergaben, daß es hierbei zu einer Anlagerung des denaturierten Hämoglobins an die Membran kommt, wobei Disulfidbindungen zwischen den sehr reaktiven SH-Gruppen des denaturierten Hämoglobins und den Membranthiolgruppen angenommen werden (63, 104). Die sich ergebende Blockade der Membranthiolgruppen prädisponiert die Erythrocyten ebenso wie die Erhöhung der "Rigidität" durch die Heinz-Innenkörper zum schnellen Abbau in der Milz (105, 125).

Es konnte gezeigt werden, daß die Sulfhydrylgruppen des

Hämoglobins erst dann durch oxydierende Agentien angegriffen werden, wenn GSH fast vollständig oxydiert ist und nicht mehr zum Schutz zur Verfügung steht (2). Die reversible Met-Hb-Bildung wird dagegen durch Glutathion in weniger starkem Ausmaße verhindert (2).

Inwieweit die Sulfhydrylgruppen der Membran durch intrazelluläres GSH im reduzierten Zustand erhalten werden, ist derzeit noch nicht geklärt. Eine Anzahl der normalen Membraneigenschaften kann durch Blockade dieser Membranthiolgruppen verändert werden. So wird die Glukoseaufnahme in die Zelle erschwert (da normalerweise die Transportkapazität sehr viel größer ist als der Verbrauch, ist dies ohne Konsequenz für die Zelle) (129), die passive Permeabilität gegenüber Kationen erhöht (57) und die Membran-ATPase, die mit dem aktiven Kationentransport verbunden ist, inaktiviert (131). Bei In-vivo-Versuchen zeigen diese Zellen eine stark verkürzte Überlebenszeit mit überwiegendem Abbau in der Milz (58), bei In-vitro-Versuchen resultiert eine osmotische Hämolyse (57). Wurden die intrazellulären Sulfhydrylgruppen blockiert, konnte erst bei praktisch vollständiger Blockade des GSH eine Verkürzung der Überlebenszeit beobachtet werden. Zellform und Fragilität blieben unverändert (58). Allerdings konnte bei den In-vivo-Versuchen eine De-novo-Synthese von GSH nicht ausgeschlossen werden (52). Weiter berichtete Kosower kürzlich von Bedingungen, unter denen in vitro bei Inkubation der Erythrocyten mit einem oxydierenden Agens erst dann die Membran-SH-Gruppen angegriffen werden, wenn kein GSH mehr verfügbar ist (72).

Reduziertes Glutathion scheint weiterhin in der Stabilisierung oder Reaktivierung der sog. SH-Enzyme von Bedeutung zu sein (74, 112, 113). Darunter versteht man Enzyme, deren Aktivität an das Vorhandensein von SH-Gruppen gebunden ist, wie z.B. die G-6-PDH, Hexokinase, ATPase, 3-Phosphoglycerinaldehyddehydrogenase u.a. Sternschuss konnte jedoch keine Abnahme z.B. der Aktivität der Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase bei Reduktion des GSH-Spiegels beobachten (119) trotz der vermuteten Rolle des Glutathions als Untereinheit dieses

Enzyms (74). Kosower fand, daß die Hexokinaseaktivität erst bei einem Absinken des GSH-Wertes auf weniger als 20 % des Ausgangswertes deutlich vermindert ist (71). Im Gegensatz dazu kommt Scheuch aufgrund seiner Untersuchungen zu der Auffassung, daß die Enzyme der Glykolyse eine sich selbst stabilisierende Kette bilden, die durch Oxydation des GSH unterbrochen wird (112).

3. Hereditäre Sphärocytose (HS)

Die hereditäre Sphärocytose ist eine erbliche hämolytische Erkrankung mit autosomal dominantem Erbgang. Die Häufigkeit wird auf 1:5000 geschätzt (9a).

Das klinische Bild dieser Erkrankung wurde erstmals 1871 durch Vanlair und Masius klar umrissen (128). Chauffard erkannte 1907 die diesem Krankheitsbild zugrunde liegende Bluterkrankung und beschrieb die erbliche Anomalie der Erythrocyten, die durch verminderte Resistenz und Mikrozytose gekennzeichnet ist (24). Die Ursache der Erkrankung ist bis heute trotz zahlreicher Untersuchungen immer noch nicht völlig geklärt.

Klinik: Das allgemein bekannte klinische Bild sei hier nur kurz wiedergegeben. Die ersten Symptome treten meist in den ersten drei Jahrzehnten auf, nicht selten schon beim jungen Säugling. Kardinalsymptome sind dabei: hämolytischer Ikterus und normochrome Anämie verschiedenen Ausmaßes, Splenomegalie und familiäres Auftreten (118a). Charakteristisch ist die Neigung zu schubweiser Verschlechterung des Krankheitsbildes, oft ausgelöst durch Infekte. Diese sog. hämolytischen Krisen stellen dabei entweder aplastische Krisen oder seltener echte hämolytische Attacken dar. Durch die ausgeprägte Hyperplasie des Knochenmarks treten häufig Skelettanomalien, wie Turmschädel, Caput natiforme und Einziehung und Verbreiterung der Nasenwurzel, auf. Die körperliche und geistige Entwicklung ist oft verzögert ("lienaler Infantilismus"). Splenektomie führt in fast 100 % der Fälle zu klinischer Besserung (118a).

Das charakteristische Bild im Blutausstrich stellt der Mikrosphärocyt dar mit einem Durchmesser von ca. 6μ und einer Dicke bis zu 4μ . Das Erythrocyteneinzelvolumen ist annähernd normal oder nur wenig vermindert, die Oberfläche jedoch verkleinert. Der mittlere Hb-Gehalt der Einzelzelle ist meist normal, die mittlere Hb-Konzentration erhöht. Die osmotische Resistenz ist typisch verändert - die Hämolyse

lyse beginnt meist schon bei 0,7 - 0,5 % NaCl und ist bei 0,4 % vollständig (9a).

Pathogenese: Im Zentrum der Erkrankung steht ein korpuskulärer Defekt der Erythrocyten, der zu einer stark verkürzten Überlebenszeit dieser Zellen mit überwiegendem Abbau in der Milz führt. Zunächst vermutete Enzymdefekte der Glykolyse und des Phosphatstoffwechsels konnten nicht bestätigt werden. Alle Enzymaktivitäten, Metabolitkonzentrationen und Coenzyme lagen im Normbereich oder zeigten nur geringe Abweichungen, die mit dem erhöhten Retikulozytenanteil erklärt werden konnten (33, 82). Jakob und Jandl konnten ebenso wie Mohler und Eby sogar eine übernormale Glykolyserate nachweisen (59, 95). Die Untersuchung des Elektrolytstoffwechsels ergab, daß der passive Natriumeinstrom in die HS-Erythrocyten erhöht (11), der aktive Natriumtransport aus der Zelle auf fast das Doppelte der Norm gesteigert ist (51). Bei Inkubation der Erythrocyten konnten ein gesteigerter Turn-over der Membranphospholipide und ein Lipidverlust beobachtet werden, der durch Inkubation der Zellen in natriumfreien Medien verhindert werden konnte (60, 62, 102). Diese Befunde ließen Jacob einen Pathogeneseweg vorschlagen, an dessen Beginn die erhöhte Permeabilität für Natrium steht (62). -

Als Folge der kompensatorisch erhöhten Aktivität der Kationenpumpe komme es zu einem Membranlipidverlust (= Oberflächenverlust), der zur Mikrosphärocytose beitrage und eine Erhöhung der osmotischen Fragilität bewirke. Bei Stagnation der Erythrocyten im glukosearmen Milieu der Milzsinusoide bleibe der aktive Transport hinter dem Einstrom von Natrium zurück. Die Folge seien ein osmotisch bedingter, vermehrter Einstrom von H_2O in die Zellen, ein zusätzliches Anwachsen der osmotischen Fragilität und schließlich die Autohämolyse. -

Unklar bleibt die Ursache der erhöhten passiven Permeabilität der HS-Erythrocytenmembran gegenüber Natrium. Die Lipidzusammensetzung der Membran ist normal (101), ebenso

die qualitative Zusammensetzung der Membranproteine (134). Gabor konnte eine verminderte Anzahl von reaktiven Sulfhydrylgruppen der HS-Erythrocytenmembran nachweisen (40). Da die passive Permeabilität der Membran gegenüber Kationen u.a. sowohl von positiv geladenen NH_3 -Gruppen als auch von SH-Gruppen abhängig zu sein scheint (107, 120), könnte die Ursache in einem verminderten Gehalt an Thiolgruppen der Membran liegen (65).

4. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel

Der Mangel oder selten das völlige Fehlen der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zählt zu den häufigsten, hereditären Stoffwechselanomalien des Menschen und ist unter den Mittelmeervölkern, Negern, Persern und Arabern weit verbreitet (118b). In Deutschland ist dieser Defekt allerdings äußerst selten und nur vereinzelt nachgewiesen worden.

1956 konnte dieser Enzymmangel von Carson als Ursache der schon lange bekannten, drogeninduzierten hämolytischen Anämien nachgewiesen werden (23), in der Folgezeit auch als Ursache des sog. Favismus (123) und einer kleinen Gruppe der kongenitalen, nicht-sphärozytären hämolytischen Anämien (67). Dabei konnten aufgrund klinischer und biochemischer Unterschiede mehrere Varianten dieses Enzymdefektes gefunden werden, der X-chromosomal vererbt wird (87). Heterozygote Genträger besitzen zwei Erythrocytenpopulationen, wovon nur eine den Enzymmangel aufweist (15).

Klinik: Entsprechend der Schwere des Enzymmangels ist die klinische Symptomatik unterschiedlich. Meist kommt es nur bei Exposition mit oxydierenden Drogen, wie Primaquin, Sulfonamiden usw., mit einer Latenz von 2 - 3 Tagen zu hämolytischen Krisen mit Anämie, Ikterus, Innenkörperbildung und Retikulozytose. Auch trotz Weitergabe der auslösenden Drogen klingt die Hämolyse in der überwiegenden Zahl der Fälle innerhalb weniger Tage ab (32). Solange keine Noxen einwirken, ist die Überlebenszeit dieser "primaquinempfindlichen" Zellen meist nur gering verkürzt, die hämolytische Erkrankung also voll kompensiert (20). Sehr selten führt dieser Enzymmangel darüber hinaus zu kongenitalen, nicht-sphärozytären hämolytischen Anämien mit einer stärkeren Verkürzung der Überlebenszeit der Erythrocyten auch ohne Noxenzufuhr (67).

Pathogenese: Die G-6-PDH ist das erste Enzym in der Reak-

tionskette des Pentosephosphatzyklus und katalysiert die Oxydation von Glukose-6-Phosphat zu 6-Phosphoglukonat. Dabei wird ebenso wie in der sich anschließenden Dehydrierung des 6-Phosphoglukonat zu 3-Keto-6-Phosphoglukonat je 1 Mol NADPH gewonnen. Dieses ist innerhalb der Erythrocyten als das Coenzym einer MethHb-Reduktase und der Glutathion-reduktase bekannt und kann dort ausschließlich in obigen beiden Reaktionen erzeugt werden. Bei einer Verminderung der Aktivität der G-6-PDH ist damit aufgrund der quantitativ ungenügenden Einschleusung von G-6-P in den Pentose-shunt diese Reduktionskapazität vermindert verfügbar. Da^a die NADPH-abhängige MethHb-Reduktase nur geringe physiologische Bedeutung besitzt, findet keine Anhäufung von MethHb statt (64). Infolge der ungenügenden Reduktion des oxydierten Glutathions ist jedoch der Gehalt der Erythrocyten an GSH erniedrigt (13). Ein darüber hinaus gehender rapider Abfall des GSH-Gehaltes tritt bei Zufuhr oxydierender Drogen auf, wobei es zu einem Anstieg des GSSG-Gehaltes kommt, der allerdings nicht proportional der GSH-Verminderung ist (122).

Die Folge sind Präzipitation des Hämoglobins in Innenkörper, schneller Abbau dieser Erythrocyten in der Milz und teilweise auch intravasale Hämolyse. Der genaue Mechanismus dieser Hämolyse ist bisher noch unbekannt. Es wird jedoch angenommen, daß sie auf einen Ausfall der Schutzwirkung, die Glutathion normalerweise gegenüber eine intrazelläre Oxydation ausübt, zurückzuführen ist.

Das spontane Abklingen der hämolytischen Krisen konnte durch die höhere Aktivität der G-6-PDH in den aus der Regeneration einfließenden jungen Zellen erklärt werden (86).

5. Cystinose

Die Cystinose zählt zu den hereditären, autosomal-rezessiven Stoffwechselerkrankungen mit einer geschätzten Häufigkeit von 1:40000 der Gesamtbevölkerung (79). Sie ist gekennzeichnet durch die Ablagerung von Cystinkristallen in Cornea, Conjunktiva und retikuloendothelialen Organen wie Milz, Leber, Lymphknoten und Knochenmark. Dabei sind zwei Formen möglich: die benigne Cystinose des Erwachsenenalters und die spätestens im zweiten Lebensjahrzehnt tödlich endende Cystinose des Kindesalters. Auf die Erwachsenenform soll hier nicht näher eingegangen werden, da die von uns untersuchten Patienten alle an der kindlichen Form erkrankt waren.

Alberhalden beschrieb 1903 erstmals eine massive Ablagerung von Cystinkristallen in Leber und Milz eines 21 Monate alten Kindes, das unter den Erscheinungen der Dystrophie gestorben war (1). Lignac berichtete 1924 als erster über die klinischen Erscheinungen an drei ähnlichen Fällen (76). Seit 1941 kann die Diagnose durch den einfachen Nachweis von Cystinkristallablagerungen in der Cornea mit Hilfe der Spaltlampenuntersuchung gestellt werden (22).

Klinik: Die ersten Krankheitssymptome treten nach einer bis dahin relativ normalen Entwicklung meist im 5. - 6. Lebensmonat auf und bestehen in Nahrungsverweigerung, Erbrechen, Dehydratation und unklaren Fieberschüben. Es folgen Gewichtsstillstand, mangelhaftes Längenwachstum, Vit. D-resistente Rachitis und eine besonders kennzeichnende Photophobie. Als Zeichen der sekundären tubulären Nierenschädigung finden sich u.a. eine generalisierte Aminoacidurie, Glukosurie und Hyperphosphaturie, und allmählich treten zu den Zeichen der tubulären Nierenschädigung auch die einer glomerulären Insuffizienz auf. Der Tod tritt entweder durch Elektrolytkrisen schon im Säuglingsalter oder spätestens infolge einer Urämie im 2. Lebensjahrzehnt ein (79).

Die Diagnose kann sowohl durch die oben erwähnte Spaltlampenuntersuchung als auch durch den histologischen Nachweis von Cystinkristallen im Knochenmark-, Lymphknoten- oder Conjunktivabiopsiematerial gesichert werden. Therapeutisch wird derzeit eine methionin- und cystinbeschränkte Diät empfohlen (79, 80), von anderen Autoren der Versuch, die Cystinausscheidung durch Penicillamin zu erhöhen (25).

Biochemische Befunde: Trotz zahlreicher Untersuchungen sind Ätiologie und Pathogenese immer noch ungeklärt. .

Die Tatsache, daß die Cystinablagerung vor allem in retikuloendothelialen Zellen stattfindet, ließ vermuten, daß die Kristalle extrazellulär ausfallen und dann phagocytiert werden (116). Im Blutplasma und anderen extrazellulären Flüssigkeiten wurden jedoch normale Konzentrationen von Cystein und Cystin gefunden (21, 30). Darüber hinaus entstehen auch im Plasma von Cystinosepatienten bei Zugabe von Cystin erst dann gesättigte Lösungen, wenn die normale Konzentration auf fast das 50fache erhöht wird (116).

Das Disulfid Cystin bildet zusammen mit seiner reduzierten Form, dem Cystein, ein Redoxsystem. Während normalerweise im extrazellulären Raum vorwiegend die Disulfidform vorliegt, ist intrazellulär die Cystein/Cystin-Relation zugunsten des Cysteins verschoben (31). Obwohl eine direkte, nichtenzymatische Reduktion von Cystin zu Cystein durch GSH möglich ist, existiert darüber hinaus ein Enzym, die Glutathion-Cystin-Transhydrogenase, das diese Reaktion katalysiert (115). Ein Defekt dieses Enzyms würde die Anhäufung der Cystinkristalle am einfachsten erklären. Die Aktivität dieser Transhydrogenase und ebenso einer NADH-abhängigen Cystin-Oxidoreduktase in der Leber ist jedoch normal (99). Ebenso ist die Aktivität der Glutathionreduktase des peripheren Blutes normal (115). Ursache der Cystinablagerung könnte auch ein genetischer Defekt im intermediären Methionin-Cystein-Stoffwechsel sein, wobei

besonders eine Störung im oxydativen Abbau des Cysteins diskutiert wird (78, 99, 115). Dabei kommt u.a. ein Enzymdefekt einer Desulfinase in Frage, die SO_2 aus der Cysteinsulfinsäure abspaltet (7). Die genauen Stoffwechselwege der S-haltigen Aminosäuren im menschlichen Organismus sind allerdings noch nicht völlig geklärt, so daß der Nachweis eines Enzymdefektes noch aussteht.

Die für den Krankheitsverlauf entscheidende Nierenschädigung ist wahrscheinlich nicht direkt durch die Cystinablagerungen in der Niere bedingt, sondern Folge des gestörten Stoffwechsels der S-haltigen Aminosäuren (7). Linneweh diskutiert dabei toxische Effekte, Redoxpotentialverschiebungen durch den Mangel an freien Sulfhydrylgruppen oder Enzymhemmungen (79). Patrick konnte nachweisen, daß die Cystinablagerungen eine Reihe von Enzymen hemmen, für deren Aktivität SH-Gruppen wesentlich sind (100).

6. Leukämie

Als Leukosen bezeichnet man nach Begemann (9b) generalisierte, wahrscheinlich neoplastische Wucherungen der weißen Blutzellensysteme mit unbekannter Ätiologie. Gekennzeichnet sind sie durch quantitative und qualitative Veränderungen der weißen Blutkörperchen und ihrer Vorstufen im Blut sowie in den parenchymatösen Organen wie Knochenmark, Milz und Leber. Dabei werden im peripheren Blut erhöhte, normale und subnormale Leukocytenzahlen beobachtet. Die jährliche Morbidität beträgt 40 - 70/Mill. der Gesamtbevölkerung (3, 9b). Dabei wird von den meisten Autoren eine Häufigkeitszunahme beschrieben, während Fraumeni von einer Abnahme der Mortalität der weißen Bevölkerung der USA in den letzten Jahren berichtet (38). Der erste Mortalitätsgipfel liegt zwischen dem 2. - 5. Lebensjahr mit einer Häufung der akuten Leukosen, es folgt ein Minimum zwischen dem 20. - 30. Lebensjahr und ein steiler Anstieg ab dem 50. Lebensjahr mit Zunahme aller Formen (3, 28, 29).

Da Ätiologie und Pathogenese der Leukosen noch unbekannt sind, muß die Einteilung nach klinischen und morphologischen Kriterien erfolgen. Die häufigsten Formen stellen die akuten Leukosen neben der chronisch myeloischen und chronisch lymphatischen Leukämie dar. Daneben werden noch seltener vorkommende Formen wie die Erythroleukämie, tumorbildende Leukämien u.a. unterschieden (9b).

Auf das allgemein bekannte klinische Bild der Leukosen braucht hier nicht näher eingegangen zu werden. Es sollen nur einige wichtige hämatologische Befunde der beiden von uns untersuchten Formen (akute Leukosen und chronisch myeloische Leukämie) angeführt werden: Bei den akuten Leukosen findet sich im peripheren Blutbild neben einer Anämie und Thrombopenie meist der charakteristische Hiatus leucæmicus mit völlig unreifen Zellen neben wenigen ausgereiften. Daneben kann das Blutbild aber auch von einer einzigen uniformen, abnormen Zellform beherrscht sein. Im Knochenmark fällt die Uniformität der Zellen auf mit starker Verminde-

rung der Erythro- und Thrombopoese und nur wenigen reifen Formen der Granulopoese. Die chronisch myeloische Leukämie ist durch das Vorkommen myeloischer Vorstufen aller Reifegrade neben reifen Segmentkernigen im peripheren Blut gekennzeichnet. Dabei zeigen weniger als 20 % der Granulocyten eine positive alkalische Phosphatase-Reaktion. Im Knochenmark sind hier die Veränderungen mehr quantitativer Natur, mit starker Vermehrung der Zellen der Granulopoese und Verdrängung der Erythro- und Thrombopoese.

Zahlreiche Theorien zur Leukämieentstehung liegen vor. Gesichert ist für die Leukämie des Menschen der Zusammenhang mit Carcinogenen, wie ionisierenden Strahlen und Kohlenwasserstoffen (42, 84).

Schon kurz nach der Isolation des GSH wurde von Hammet die Vermutung geäußert, daß dessen SH-Gruppen ein wichtiger Stimulator für die Zellteilung seien. Verschiebungen des SH-SS-Redoxgleichgewichtes zur reduzierten Form sollten zur Zellteilung führen, Verschiebungen zur oxydierten Form die Teilung hemmen (45). Dabei könnten nach Swann durch die intrazellären Redoxverschiebungen Enzyme reguliert werden, die für die Mitose wichtig sind (121). Harrington entwickelte kürzlich eine Hypothese, nach der Enzymsysteme, die normalerweise den GSH-Gehalt der Zelle im Normbereich halten, ein Punkt im Angriff der Carcinogene seien (50). Eine daraus resultierende Suppression des GSH-Spiegels der Zelle führe zur Mitoseverminderung. Ein überkompensierender Mechanismus, der in einer Vermehrung der GSH-Synthetase liegen könnte, befreie die Zelle von diesem inhibitorischen Effekt. Die Folge sei eine Zellpopulation ohne kontrollierte Teilung.

Mehrere Befunde deuten auf eine Störung des Stoffwechsels der wasserlöslichen SH-Komponenten in den weißen und roten Blutzellen bei Leukosen hin. So fanden Contopoulos und Anderson eine Erhöhung des GSH-Gehaltes der Erythrocyten und Leukocyten bei akuten und chronischen Leukämien; Sabine bestätigte diese Befunde für die Erythrocyten (27, 109).

Im Gegensatz dazu berichtet Hardin, daß bei der chronisch myeloischen und chronisch lymphatischen Leukämie der GSH-Gehalt der Leukocyten leicht erniedrigt sei, der der Erythrocyten im Normbereich liege (46).

Harrap und Speed konnten in den Leukocyten und ganz vereinzelt auch in den Erythrocyten von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie und einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie eine Erhöhung des Gehaltes an wasserlöslichen Disulfiden nachweisen. Der Gesamt-SH-Gehalt der Erythrocyten dieser Patienten lag im oberen Normbereich, der der Leukocyten im unteren Bereich der Norm (47).

C. Eigene Fragestellung

Über das Ergothionein liegen im Gegensatz zum Glutathion wenig klinische Erfahrungen vor. Bisher befaßten sich die Untersuchungen im wesentlichen mit der Methodik seiner Bestimmung und dem normalen Gehalt in den Erythrocyten. Da Ergothionein durch den Besitz einer freien SH-Gruppe als Redoxsystem fungieren kann, ist zu vermuten, daß es an den Schutzwirkungen der nichtproteinären SH-Komponenten der Erythrocyten mit beteiligt ist. Die quantitativ bedeutsamste dieser Komponenten stellt Glutathion dar. Dabei wird bei der meist verwandten Bestimmung des Glutathion nach Beutler (14) auch Ergothionein mit erfaßt. Störungen, die bisher auf Veränderungen des GSH-Gehaltes zurückgeführt wurden, könnten demnach auch durch Veränderungen des Ergothioneingehaltes mit bedingt sein.

Zur Abklärung der biochemischen Bedeutung des Ergothioneins und seines Metabolismus innerhalb der Erythrocyten untersuchten wir den Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bei Erkrankungen, bei denen Störungen des SH-Metabolismus vorhanden oder zu vermuten sind, unter folgenden Einzelfragestellungen:

1. Hereditäre Sphärocytose: Als Ursache der erhöhten passiven Membranpermeabilität der HS-Erythrocyten für Natrium wird von Jandl die von Gabor gefundene Abnahme der Thiolgruppen der Membran diskutiert (65, 40). Infolge der vermuteten Beziehungen zwischen den intrazellulären und membrangebundenen SH-Gruppen (97) ergibt sich die Frage, ob die Verminderung der Membran-SH-Gruppen mit einer Verminderung der intrazellulären wasserlöslichen SH-Komponenten korreliert ist. Über den Ergothioneingehalt liegen noch keine Ergebnisse vor, für GSH wurden normale Werte gefunden (82). Als Bezugssystem wurde bisher jedoch nur "100 ml Erythrocyten" gewählt. Es war zu klären, ob der GSH-Gehalt auch dann normal ist, wenn der Einzelerythrocyt als Bezugs-

system gewählt wird. Denn bei mikrocytären Kugelzellen finden sich in 100 ml mehr Erythrocyten als bei normal geformten Zellen (9a). Somit könnte der "normale" GSH-Gehalt durch die vermehrte Zellzahl pro Volumeneinheit bedingt sein, die Einzelzelle jedoch einen GSH-Mangel aufweisen. Unter diesen Gesichtspunkten war auch der bisher noch nicht bestimmte Ergothioneingehalt zu untersuchen.

2. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel: Im Mittelpunkt der Pathogenese der hämolytischen Erkrankung bei G-6-PDH-Mangel steht die verminderte Bereitstellung an NADPH innerhalb der Erythrocyten. Infolge der dadurch ungenügenden Reduktion von GSSG durch die NADPH-abhängige Glutathionreduktase ist der Gehalt an Glutathion vermindert mit weiterem Abfall bei Zufuhr oxydierender Noxen. Über das Verhalten des Ergothioneingehaltes liegen bisher keine Untersuchungen vor. Durch dessen Bestimmung bei dieser Erkrankung sollte die Frage geklärt werden, ob der Ergothioneingehalt ähnlich dem GSH-Gehalt von der Bereitstellung an NADPH abhängig ist.

3. Cystinose: Die Cystinose ist eine Stoffwechselstörung, bei der es aus bisher noch unklarer Ursache zu einer Ablagerung des Disulfides Cystin in vielen Organen kommt. Es interessierte die Frage, ob durch diese Anhäufung eines Disulfides im Organismus auch der Stoffwechsel der beiden nichtproteinären SH-Komponenten, Ergothionein und Glutathion, innerhalb der Erythrocyten beeinflusst wird.

4. Leukämie: In den Leukocyten und Erythrocyten von Patienten mit Leukämien wurde von verschiedenen Autoren teils eine Erhöhung, teils eine Erniedrigung der wasserlöslichen Sulfhydrylkomponenten gefunden, die auf Veränderungen des GSH-Gehaltes dieser Zellen zurückgeführt wurden (27, 43, 46, 47, 109). Infolge unterschiedlicher Bezugssysteme und Methoden sind die bisherigen Befunde jedoch uneinheitlich.

Sabine diskutiert weiterhin, daß die von ihr gefundene Vermehrung der SH-Gruppen in diesen Zellen durch eine andere Komponente als GSH bedingt sein könnte, die ähnliche Reaktionen wie dieses gebe (109). Es sollte hier überprüft werden, ob der GSH-Gehalt der Erythrocyten bei Patienten mit chronisch myeloischen und akuten Leukämien auch bei Wahl der Einzelzelle als Bezugssystem von der Norm abweicht. Weiterhin war zu klären, ob die von verschiedenen Autoren gefundene Veränderung des "GSH-Gehaltes" durch eine Veränderung des Ergothioneingehaltes mit bedingt ist.

D. Material und Methoden

1. Reagentien¹

Äthylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz (Titriplex^R III)
 $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$
Mol.-Gew. 372,24
Merck No. 8418

Bleiacetat $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$
Mol.-Gew. 379,33
Merck No. 7375

Bleimonoxyd PbO
Mol.-Gew. 223,19
Merck No. 7401

2.2'-Dinitro-5.5'-dithiodibenzoessäure $C_{14}H_8N_2O_8S_2$
Mol.-Gew. 396,36
Merck No. 3291

Essigsäure (99-100%) CH_3COOH
Mol.-Gew. 60,05
Merck No. 90063

Natriumacetat, wasserfrei $NaCH_3COO$
Mol.-Gew. 82,03
Merck No. 6268

Natriumcarbonat, wasserfrei Na_2CO_3
Mol.-Gew. 105,99
Merck No. 6392

Natriumchlorid $NaCl$
Mol.-Gew. 58,44
Merck No. 6404

tri-Natriumcitrat-5,5-hydrat $Na_3H_5C_6O_7 \cdot 5,5H_2O$
Mol.-Gew. 357,16
Merck No. 6436

Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$
Mol.-Gew. 137,99
Merck No. 6346

Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$
Mol.-Gew. 156,01
Merck No. 6345

1 Sofern nicht anders vermerkt, wurden die Reagentien von der Firma E.Merck, 61 Darmstadt, bezogen.

di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei Na_2HPO_4
Mol.-Gew. 141,96
Merck No. 6586

Natriumhydroxyd NaOH
Mol.-Gew. 40,00
Merck No. 6498

Natriumoxalat $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$
Mol.-Gew. 134,00
Merck No. 6557

Natriumnitrit NaNO_2
Mol.-Gew. 69,00
Merck No. 6549

meta-Phosphorsäure $(\text{HPO}_3)_n$
Merck No. 571

Salzsäure HCl
Mol.-Gew. 36,46
Merck No. 317

Sulfanilsäure $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_3\text{S}$
Mol.-Gew. 173,19
Merck No. 686

2. Lösungen

ACD-Stabilisator (Formel B)²
13,2 g Natriumcitricum neutr. • $2\text{H}_2\text{O}$
4,4 g Acidum citricum
14,7 g Sacchar. amylac. • H_2O
Aqua pro inject. ad 1000 ml

0,15 M isotonischer Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,4
170 ml 0,15 M Natriumdihydrogenphosphat-2-hydrat
ad 1000 ml 0,15 M di-Natriumhydrogenphosphat

Gepufferte, isotone Kochsalzlösung
1/10 isotoner 0,15 M Natrium-Phosphatpuffer, pH 7,4
9/10 isotone Kochsalzlösung

Lösungen zur Ergothioneinbestimmung

Essigsäurelösung
3 ml 1n Essigsäure (1n Essigsäure: 60,05 ml 99-100%
Essigsäure, ad 1000 ml aqua bidest.)
160 mg Natriumoxalat
ad 1000 ml aqua bidest.

Goulards Extrakt

220 g Bleiacetat
140 g Bleimonoxyd

aqua bidest. ad 1000 ml

Diese Suspension wird 30 min über einem heizbaren Magnetrührer bei Siedetemperatur gerührt. Die abgekühlte Lösung wird vakuumfiltriert (Papierfilter) und mit CO₂-freiem aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung muß verschlossen aufbewahrt werden.

10%ige Natriumhydrogenphosphatlösung

10 g Natriumdihydrogenphosphat-1-hydrat
ad 100 ml aqua bidest.

Alkalipuffer

1 g Natriumcarbonat, wasserfrei
10 g Natriumacetat, wasserfrei
ad 100 ml aqua bidest.

Diazoreagenz

Stammlösung 1: 9 g Sulfanilsäure
90 ml HCl 37%
ad 1000 ml aqua bidest.

Stammlösung 2: 5 g Natriumnitrit
ad 100 ml aqua bidest.

In einen im Eisbad stehenden Zylinder werden pipettiert:

1,5 ml Stammlösung 1

1,5 ml Stammlösung 2

nach 5 min Zugabe von 6 ml Stammlösung 2

nach weiteren 5 min aqua bidest. ad 50 ml

Die entstandene Lösung muß gut durchmischt werden.

Dieses Reagenz muß für jede Bestimmung neu aus den beiden Stammlösungen hergestellt werden.

Natronlauge

400 g NaOH
ad 1000 ml aqua bidest.

Lösungen für GSH-Bestimmung

Eiweißfällungslösung

6,7 g meta-Phosphorsäure
2,0 g Äthylendiamintetraessigsäure
300,0 g NaCl
ad 1000 ml aqua bidest.

Die Lösung ist etwa 3 Wochen bei +4°C haltbar.

Verdünnte Eiweißfällungslösung

3 Teile Eiweißfällungslösung
2 Teile aqua bidest.

0,3 M Phosphatpuffer

53,5 g di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei
ad 1000 ml aqua bidest.

Bei Aufbewahrung bei +4°C bilden sich Kristalle, die bei Erwärmen wieder in Lösung gehen.

DTNB-Reagenz

40 mg 2.2'-Dinitro-5.5'-dithiodibenzoesäure
ad 100 ml 1%ige Natriumcitratlösung

3. Meßmethodik

a) Herstellung der Erythrocytensuspension zur Ergothionein- und GSH-Bestimmung

Um für den Ergothionein- und GSH-Gehalt Werte zu erhalten, die exakt miteinander vergleichbar sind, wurde für beide Bestimmungen dieselbe Erythrocytensuspension benützt.

Nüchternblut der Patienten wird in ACD-Stabilisator abgenommen und innerhalb von 12 Stunden verarbeitet. Das Blut wird bei +4°C und 200 g (entspricht ca. 1500 U/min) 10 min in einer Kühlzentrifuge³ zentrifugiert. Das Plasma und die oberste Schicht des Erythrocytensediments werden vorsichtig abpipettiert. Danach werden die Erythrocyten 3mal mit gepufferter, isotoner Kochsalzlösung gewaschen; der jeweilige Überstand nach der Zentrifugation (10 min bei 200 g, +4°C) wird abpipettiert. Das so erhaltene Erythrocytensediment wird mit gepufferter isotoner Kochsalzlösung auf einen Hämatokrit zwischen 40 und 60 % resuspendiert. Diese Suspension wurde für die Bestimmung des Ergothionein- und GSH-Gehalts benützt.

Die Hämatokritbestimmung wurde nach der Mikrohämatokritmethode durchgeführt, die Erythrocytenzählung erfolgte im Cellooskop⁴.

b) Bestimmung des Ergothioneingehaltes

Der Gehalt an Ergothionein wurde nach der von Fues modifizierten Methode nach Hunter bestimmt (39, 56).

³ Firma Heraeus-Christ, 336 Osterode, Harz

⁴ Cellooskop 202, Firma A-B Lars, Ljungberg u.Co, Stockholm

0,5 ml Erythrocytensuspension werden zu 4,5 ml der 0,003 n Essigsäure, die 160 mg Natriumoxalat/l enthält, pipettiert. Das Hämolysat wird 5 min unter gelegentlichem Rühren im siedenden Wasserbad gekocht und nach dem Erkalten filtriert (Schwerefiltration über Papierfilter). In das Filtrat werden mit einer Marburg-Pipette⁵ 0,05 ml Goulards Extrakt gegeben, der entstehende Niederschlag 10 min bei 2000 g (entspricht ca. 6000 U/min) abzentrifugiert. Zu dem abdekantierten Überstand werden 0,05 ml Natriumhydrogenphosphat (10%ig) mit einer Marburg-Pipette⁵ zugefügt. Der entstehende Niederschlag wird erneut bei 2000 g 10 min abzentrifugiert; der abdekantierte ^{*} Überstand wird einer Diazofärbung unterzogen.

Diazofärbung: In ein im Eisbad stehendes Röhrchen werden 1 ml eisgekühltes aqua bidest., 1 ml Diazoreagenz und 2 ml Alkalipuffer pipettiert. Nach 30 sec werden 1 ml der zu färbenden Testlösung hinzugegeben und die Lösungen gründlich durchmischt. Nach weiteren exakt 45 sec Zugabe von 5 ml Natronlauge: Herausnahme des Röhrchens aus dem Eisbad und erneute gute Durchmischung des Inhaltes. 10 min bei Zimmertemperatur stehen lassen und anschließende Entfernung der entstandenen Gasbläschen durch sorgfältiges Schütteln.

Der Blindwert enthält statt 1 ml Testlösung 1 ml aqua bidest.

Die Extinktionen werden anschließend bei 509 m μ und einer Schichtdicke von 2 cm im Eppendorf-Photometer⁵ gemessen.

Die Ergothioneinkonzentration berechnet sich nach der Formel:

$$\text{mg Ergothionein/100 ml Erythrocytensuspension} = \Delta E \times 0,508 \times 100$$

Dabei bedeuten:

ΔE = gemessene Extinktionsdifferenz

0,508 = Faktor, der aus dem Ergothioneingehalt in mg im Standardtestansatz und der gemessenen Extinktion berechnet wurde

100 = Faktor, der sich aus der Verdünnung des Testansatzes ergibt

Der Ergothioneingehalt wird angegeben in

mg/100 ml gepackte Erythrocyten
(bezogen auf einen Hämatokritwert von 100 %)

und in

mg/10¹¹ Erythrocyten

Berechnungsbeispiel: Die nach 3.a) vorbereitete Erythrocytensuspension besitze einen Hämatokrit von 50 %, die Erythrocytenzahl betrage 5,2 Mill/mm³; die gemessene Extinktionsdifferenz ΔE betrage 0,05.

$$\frac{\text{mg Ergothionein/100 ml gepackte Erythrocyten}}{0,05 \times 0,508 \times 100 \times \frac{100}{50}} =$$

Durch den Faktor $\frac{100}{50}$ erfolgt die Umrechnung vom gemessenen Hämatokrit = 50 % auf einen Hämatokritwert von 100 %.

$$\frac{\text{mg Ergothionein/10¹¹ Erythrocyten}}{0,05 \times 0,508 \times 100 \times 10^{11}} = \frac{5,2 \times 10^{11}}{5,2 \times 10^{11}}$$

c) Bestimmung des GSH-Gehalts

Der Gehalt an reduziertem Glutathion wurde nach der Methode von Beutler u.a. bestimmt (14). Beutler gibt allerdings die Verwendung von Vollblut an. Wir verwandten eine für die Ergothioneinbestimmung erforderliche gewaschene

Erythrocytensuspension, um den Ergothionein- und GSH-Gehalt exakt miteinander vergleichen zu können (s. unter a)).

0,2 ml Erythrocytensuspension werden zu 1,8 ml aqua bidest. pipettiert. Dazu 3 ml der Eiweißfällungslösung. Nach 5 min filtrieren und 2 ml des entstehenden Filtrats zu 8 ml des 0,3 M Phosphatpuffers pipettieren. Nach Zugabe von 1 ml DTNB-Reagenz wird der Inhalt gründlich durchmischt.

Der Blindwert enthält statt 2 ml Filtrat 2 ml der 3:2 verdünnten Eiweißfällungslösung.

Die Extinktion wird sofort anschließend bei 405 m μ und einer Schichtdicke von 1 cm im Eppendorf-Photometer gemessen.

Die GSH-Konzentration berechnet sich nach der Formel:

$$\text{mg GSH/100 ml Erythrocytensuspension} = \Delta E \times 310,4 \times 1,01$$

Hierbei bedeuten:

ΔE = gemessene Extinktionsdifferenz

310,4 = Faktor aus dem molaren Extinktionskoeffizienten von GSH und der Verdünnung des Testansatzes

1,01 = Korrektur für das Eppendorf-Photometer

Der GSH-Gehalt wird angegeben in

$$\frac{\text{mg/100 ml gepackte Erythrocyten}}{(\text{bezogen auf einen Hämatokritwert von 100 \%})}$$

und in

$$\frac{\text{mg/10}^{11} \text{ Erythrocyten}}$$

Berechnungsbeispiel: Die nach 3.a) vorbereitete Erythrocytensuspension besitze einen Hämatokritwert von 50 %, die Erythrocytenzahl betrage 5,2 Mill/mm³; die gemessene Extinktionsdifferenz ΔE betrage 0,15.

$$\frac{\text{mg GSH/100 ml gepackte Erythrocyten}}{= 0,15 \times 310,4 \times 1,01 \times \frac{100}{50}}$$

Durch den Faktor $\frac{100}{50}$ erfolgt die Umrechnung vom gemessenen Hämatokrit = 50 % auf einen Hämatokritwert von 100 %.

$$\underline{\text{mg GSH}/10^{11} \text{ Erythrocyten}} = \frac{0,15 \times 310,4 \times 1,01 \times 10^{11}}{5,2 \times 10^{11}}$$

4. Statistische Sicherung der Versuchsergebnisse

Für den statistischen Vergleich zweier Versuchsgruppen bedienen wir uns der t-Verteilung nach Student.

Zunächst wird der Mittelwert $\bar{x}$ einer Stichprobe mit den Einzelwerten $x_1, x_2, \dots, x_n$ berechnet, der definiert ist als der Quotient aus der Summe der Einzelwerte x_i dividiert durch die Anzahl n der Einzelwerte.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Die Standardabweichung s , die die mittlere Abweichung des Einzelwertes vom Mittelwert darstellt und als Maß bei der Abgrenzung des Normbereichs dient, berechnet sich nach:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Der t-Wert kann nun aus der Formel ermittelt werden:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Die Zahl der Freiheitsgrade beträgt:

$$n_1 + n_2 - 2$$

Aus der Tabelle "Signifikanzschranken" der Studentverteilung (44) wird der zugehörige p-Wert ermittelt.

Als Grad für die statistische Auswertung der Versuche wird angenommen:

$$p \leq 0,05 \longrightarrow \text{signifikanter Unterschied}$$

E. E r g e b n i s s e

1. Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bei hereditärer Sphärocytose

Bei vier Patienten mit hereditärer Sphärocytose wurden der Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bestimmt und deren Relation zueinander berechnet.

Diese Patienten stammen aus zwei Familien: Pat. M.E. (7 Jahre) ist die Tochter von Pat. Y.E. (29 Jahre), Pat. A.P. (6 Jahre) der Sohn von Pat. Al.P. (34 Jahre). Zum Zeitpunkt der Untersuchung waren Pat. M.E., Pat. Y.E. (beide Splenektomie mit 5 Jahren) und Pat. Al.P. (keine Splenektomie) klinisch erscheinungsfrei, Pat. A.P. (keine Splenektomie) zeigte eine ausgeprägte Anämie und Skelettdeformitäten.

Nähere Angaben über Anamnese, klinischen Befund und Labordaten der Patienten sind jeweils im Anhang angeführt.

Die Ergebnisse sind in Tab. I zusammengefaßt (s. Anhang); Abb. 4 - 7 veranschaulichen diese Ergebnisse.

Als Normalwerte des Ergothionein- und GSH-Gehaltes der Erythrocyten wurden in dieser Arbeit die von Fues 1972 an einem Normalkollektiv mit derselben Methodik ermittelten Werte zugrunde gelegt (30).

a) Ergothioneingehalt

Für den Ergothioneingehalt/100 ml Erythrocyten wurden bei den beiden Patienten aus Familie E. Werte im oberen Bereich der Norm gefunden, während sie bei den beiden Patienten aus Familie P. im unteren Normbereich lagen. Der Mittelwert aus diesen vier Bestimmungen zeigt keine Abweichung vom Normalwert ($p \sim 0,5$).

(Da infolge der Seltenheit der hier untersuchten Krankheitsbilder die Fallzahlen n sehr niedrig sind, so daß

bezüglich eines signifikanten Unterschiedes keine eindeutigen Aussagen gemacht werden können, wird nur der jeweils errechnete p-Wert angeführt.)

Wurde als Bezugssystem die Zellzahl gewählt, ergab sich jedoch ein anderes Bild. Bezogen auf 10^{11} Erythrocyten, war der Ergothioneingehalt bei den beiden Patienten aus Familie P. um mehr als die Hälfte der Norm erniedrigt, bei den zwei Patienten aus Familie E. lag er im unteren Bereich der Norm. Damit ergibt sich ein Mittelwert von $0,26 \pm 0,10$ mg Ergothionein/ 10^{11} Erythrocyten, der - verglichen mit dem Normalwert von $0,40 \pm 0,13$ mg Ergothionein/ 10^{11} Erythrocyten - deutlich erniedrigt ist ($p < 0,0125$). Abb. 4a und 4b veranschaulichen diese Ergebnisse.

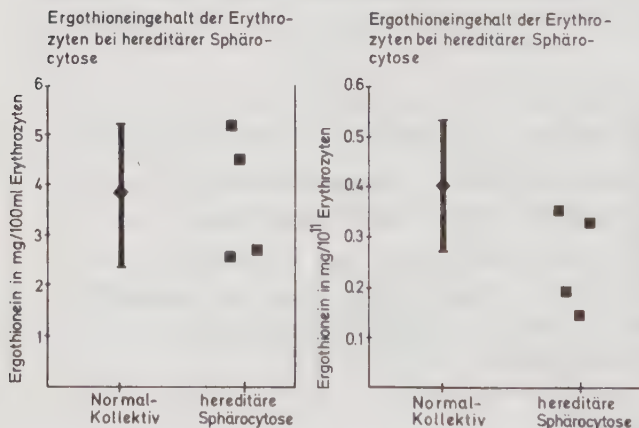


Abb. 4a

Abb. 4b

Abb. 4a und 4b: Ergothioneingehalt der Erythrocyten von Patienten mit hereditärer Sphärocytose im Vergleich zu einem Normalkollektiv (Abb. 4a bezogen auf 100 ml Erythrocyten, Abb. 4b bezogen auf 10^{11} Erythrocyten)

b) GSH-Gehalt

Ein analoges Verhalten zeigte der GSH-Gehalt. Bezogen auf 100 ml Erythrocyten, fand sich ein normaler GSH-Gehalt. Hierbei besteht Übereinstimmung mit Literaturangaben (82). Bezogen auf 10^{11} Erythrocyten, lag er jedoch bei allen Patienten bis auf Pat. Al.P. unterhalb der unteren Grenzen der Norm, bei Pat. Al.P. im untersten Normbereich.

Beim Vergleich des errechneten Mittelwertes von $5,6 \pm 0,5$ mg GSH/ 10^{11} Erythrocyten mit dem Normalwert von $7,6 \pm 1,7$ mg GSH/ 10^{11} Erythrocyten ergibt sich ein p-Wert von $<0,0025$.

Abb. 5a und 5b veranschaulichen dieses Ergebnis.

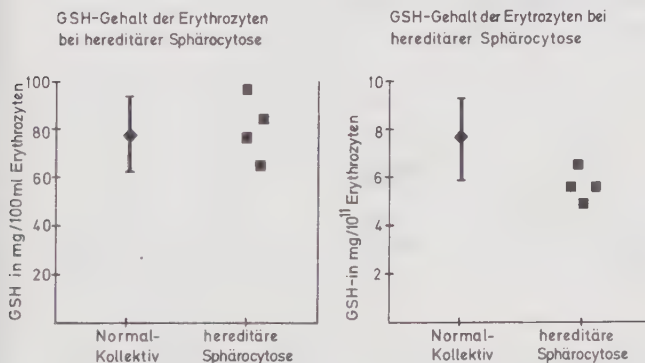


Abb. 5a

Abb. 5b

Abb. 5a und 5b: GSH-Gehalt der Erythrocyten von Patienten mit hereditärer Sphärocytose im Vergleich zu einem Normalkollektiv (Abb. 5a bezogen auf 100 ml Erythrocyten, Abb. 5b bezogen auf 10^{11} Erythrocyten)

c) Relation: Ergothionein-/GSH-Gehalt

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob eine der beiden SH-Komponenten der Erythrocyten stärker erniedrigt ist

als die andere, wurde die prozentuale Beziehung zwischen dem Ergothionein- und GSH-Gehalt in rel% (GSH-Gehalt = 100 %) berechnet. Die zwei Patienten aus Familie E. zeigten eine Relation, die den Werten eines Normalkollektivs entspricht, so daß bei ihnen eine gleichmäßige Verminderung des GSH- und Ergothioneingehalts vorliegt. Bei den beiden Patienten aus Familie P. ist diese Beziehung erniedrigt, so daß dort der Ergothioneingehalt stärker als der GSH-Gehalt abgefallen ist (Abb. 6). Der Mittelwert aus allen vier Bestimmungen ist jedoch nicht verschieden vom Normalwert ($p \sim 0,15$).

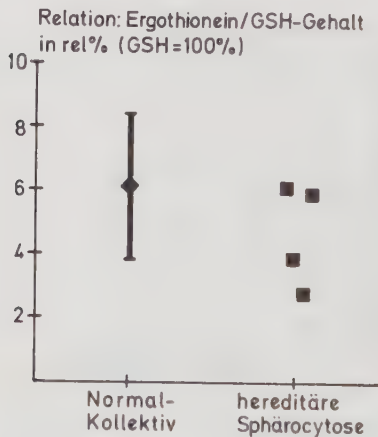


Abb. 6: Relation zwischen dem Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bei hereditärer Sphärocytose in rel% (GSH-Gehalt = 100 %). Vergleich zum Normalwert.

2. Ergothioneingehalt und seine Relation zum GSH-Gehalt in Erythrocyten mit Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel

Die Erythrocyten von zwei hemizygoten Patienten mit Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel und einer heterozygoten Genträgerin wurden auf ihren Ergothionein- und GSH-Gehalt untersucht und deren Relation zueinander berechnet.

Diese drei Probanden stammen aus einer italienischen Familie aus Sardinien. Pat. L.S. (31 Jahre) ist der Vater, die heterozygote Genträgerin M.S. (29 Jahre) die Mutter von Pat. P.S. (8 Jahre). Pat. P.S. und Pat. L.S. waren früher mehrmals an hämolytischen Krisen nach Medikamenteneinnahme erkrankt. Die Aktivität der G-6-PDH betrug bei Pat. P.S. $1,6 \text{ U}/10^{11}$ Erythrocyten (= 9 % der Norm (6)), bei Pat. L.S. $2,6 \text{ U}/10^{11}$ Erythrocyten (= 14,2 % der Norm (6)). Die heterozygote Genträgerin M.S. ist klinisch gesund und wies eine Enzymaktivität von $15,5 \text{ U}/10^{11}$ Erythrocyten (= 85 % der Norm (6)) auf.

Die Ergebnisse der Bestimmungen sind in Tab. II zusammengefaßt (s. Anhang); Abb. 7 - 9 veranschaulichen diese Ergebnisse.

a) Ergothioneingehalt

Bei beiden hemizygoten Patienten fand sich ein deutlich erniedrigter Ergothioneingehalt der Erythrocyten. Bezogen auf 100 ml Erythrocyten, war er bei Pat. L.S. um 50 %, bei Pat. P.S. um 45 % niedriger als der mittlere Gehalt bei gesunden Vergleichspersonen. Bezogen auf 10^{11} Erythrocyten, war er um 50 % bzw. um 42 % erniedrigt.

Bei der heterozygoten Genträgerin lag der Ergothioneingehalt/100 ml Erythrocyten im Normbereich, bezogen auf 10^{11} Erythrocyten an der unteren Normgrenze (Abb. 7a und 7b).

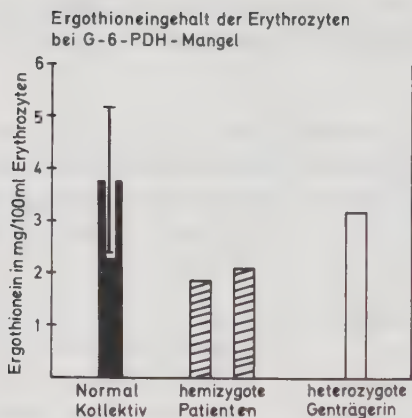


Abb. 7a: Ergothioneingehalt der Erythrocyten bei G-6-PDH-Mangel in mg/100 ml Erythrocyten im Vergleich zu einem Normalkollektiv

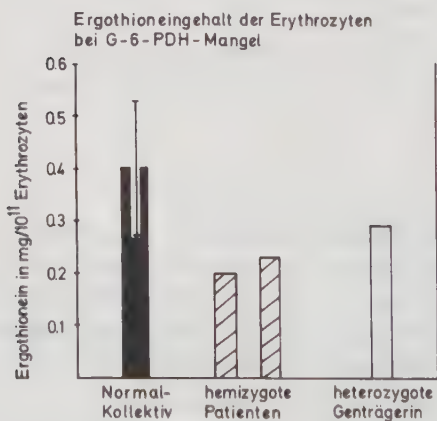


Abb. 7b: Ergothioneingehalt der Erythrocyten bei G-6-PDH-Mangel in mg/10¹¹ Erythrocyten im Vergleich zu einem Normalkollektiv

b) GSH-Gehalt (Abb. 8a und 8b)

Übereinstimmend mit Literaturergebnissen (13) war auch der GSH-Gehalt bei beiden hemizygoten Patienten deutlich vermindert. Bezogen auf 100 ml Erythrocyten, war er bei Pat. L.S. um 37 %, bei Pat. P.S. um 33 % niedriger als bei gesunden Vergleichspersonen, bezogen auf 10^{11} Erythrocyten um 33 % bzw. um 25 %. Bei der heterozygoten Genträgerin war der GSH-Gehalt normal (Abb. 8a und 8b).

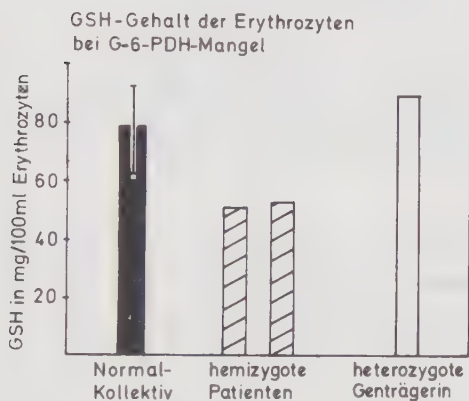


Abb. 8a: GSH-Gehalt der Erythrocyten bei G-6-PDH-Mangel in mg/100 ml Erythrocyten im Vergleich zu einem Normal-kollektiv

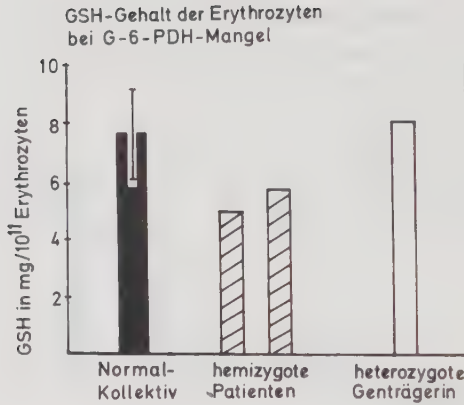


Abb. 8b: GSH-Gehalt der Erythrocyten bei G-6-PDH-Mangel in mg/10¹¹ Erythrocyten im Vergleich zu einem Normalkollektiv

c) Relation: Ergothionein-/GSH-Gehalt

Bei beiden hemizygoten Patienten war damit der Ergothioneingehalt prozentual stärker vermindert als der GSH-Gehalt. Bei Berechnung der Relation zwischen dem Ergothionein- und GSH-Gehalt (angegeben in rel%, GSH = 100 %) ergaben sich Werte, die an der untersten Grenze der Norm liegen.

Bei der heterozygoten Probandin lag diese Relation unterhalb des Normbereichs (Abb. 9).

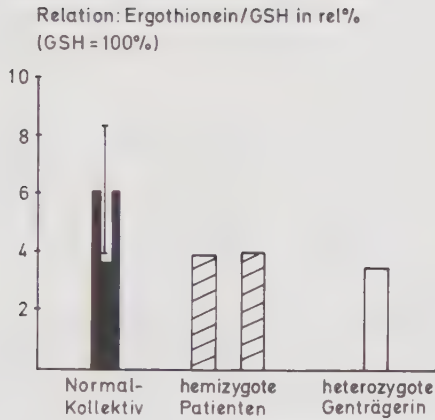


Abb. 9: Relation zwischen dem Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bei G-6-PD-Mangel in rel% (GSH = 100 %). Vergleich zum Normalwert.

3. Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bei Cystinose

Bei drei homozygoten Cystinosepatienten aus drei verschiedenen Familien und deren heterozygoten Eltern konnten wir den Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bestimmen. Von einem Patienten konnte dabei leider nur ein Elternteil untersucht werden.

Die Diagnose wurde bei allen drei Patienten durch den Nachweis von Cystinkristallablagerungen in Cornea, Conjunktiva, Lymphknoten und Knochenmark gesichert. Pat. S.F. (8 Jahre) steht seit 5 1/2 Jahren, Pat. A.K. (7 Jahre) seit 3 Jahren und Pat. A.L. (3 Jahre) seit 2 Jahren unter einem diätetischen Therapieversuch mit methionin- und cystinarmer Diät. Sowohl glomeruläre wie tubuläre Nierenfunktion waren zum Zeitpunkt der Untersuchung bei allen drei Patienten stark eingeschränkt.

Die Eltern dieser Kinder sind sämtlich klinisch gesund.

Die Ergebnisse sind in Tab. III zusammengefasst (s. Anhang).

a) Ergothioneingehalt (Abb. 10a und 10b)

Bei allen drei homozygoten Cystinosepatienten lag der Ergothioneingehalt der Erythrocyten unterhalb des Normbereichs, sowohl bezogen auf 100 ml als auch auf 10^{11} Erythrocyten. Der errechnete Mittelwert beträgt $1,8 \pm 0,5$ mg/100 ml Erythrocyten und $0,17 \pm 0,04$ mg/ 10^{11} Erythrocyten. Beim Vergleich dieser Werte mit den entsprechenden Normalwerten ergibt sich ein p-Wert von $< 0,0005$.

Die heterozygoten Genträger wiesen bis auf eine Ausnahme mit einem erniedrigten Wert einen Ergothioneingehalt innerhalb des Normbereichs auf. Der Vergleich der Mittelwerte von $3,0 \pm 1,0$ mg Ergothionein/100 ml Erythrocyten und $0,31 \pm 0,10$ mg/ 10^{11} Erythrocyten mit den Normalwerten ergibt einen p-Wert von $\sim 0,1$.

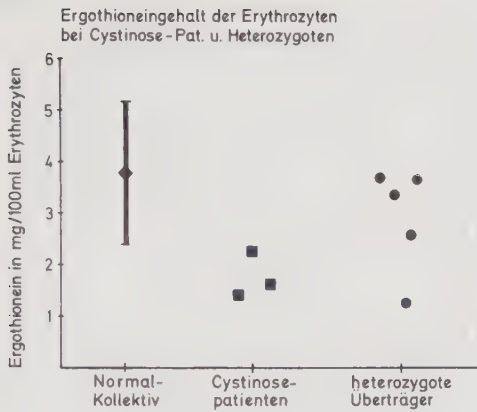


Abb. 10a: Ergothioneingehalt der Erythrocyten von Cystinosepatienten und deren Eltern (= heterozygote Überträger) in mg/100 ml Erythrocyten im Vergleich mit einem Normalkollektiv

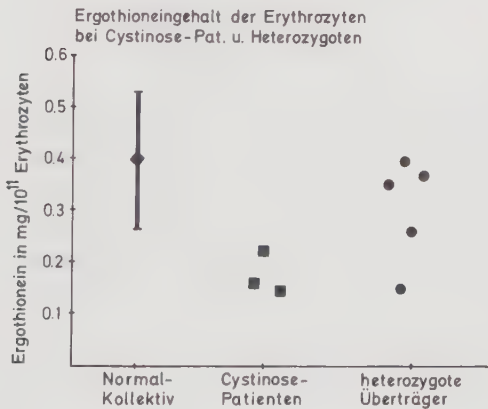


Abb. 10b: Ergothioneingehalt der Erythrocyten von Cystinosepatienten und deren Eltern (= heterozygote Überträger) in mg/10¹¹ Erythrocyten im Vergleich mit einem Normalkollektiv

b) GSH-Gehalt (Abb. 11a und 11b)

Der Gehalt an reduziertem Glutathion war bei zwei der Cystinosepatienten erniedrigt, bei Pat. A.K. lag er jedoch im oberen Bereich der Norm. Damit ergibt sich ein Mittelwert, der keinen Unterschied zum Normalwert zeigt ($p \sim 0,1$). Die Eltern der Cystinosepatienten wiesen ohne Ausnahme einen normalen GSH-Gehalt auf.

c) Relation: Ergothionein-/GSH-Gehalt (Abb. 12)

Beim Vergleich zwischen dem Ergothionein- und GSH-Gehalt der einzelnen Patienten fällt auf, daß Pat. S.F. bei noch relativ hohem Ergothioneingehalt den niedrigsten GSH-Gehalt dieser Gruppe besitzt, während Pat. A.K. bei sehr niedrigem Ergothioneinwert einen GSH-Gehalt im oberen Bereich der Norm aufweist. So liegt die Relation zwischen dem Ergothionein- und GSH-Gehalt (angegeben in rel%, GSH-Gehalt = 100 %) bei Pat. S.F. noch im unteren Bereich der Norm, während sie bei den beiden anderen Patienten unterhalb der unteren Grenzen der Norm liegt. Der Mittelwert von $3,0 \pm 1,4$ rel% ist gegenüber dem Normalwert deutlich erniedrigt ($p < 0,01$).

In der Gruppe der heterozygoten Überträger lag diese Relation bei drei Probanden im unteren Normbereich, bei Proband M.L. und M.K. unterhalb der unteren Grenzen der Norm. Dabei war sie bei M.L. um 66 %, bei M.K. um 49 % der Norm erniedrigt. Der errechnete Mittelwert von $3,8 \pm 1,1$ rel% ist damit bei den heterozygoten Überträgern ebenso wie bei den Cystinosepatienten - verglichen mit dem Normalwert - erniedrigt ($p < 0,01$).

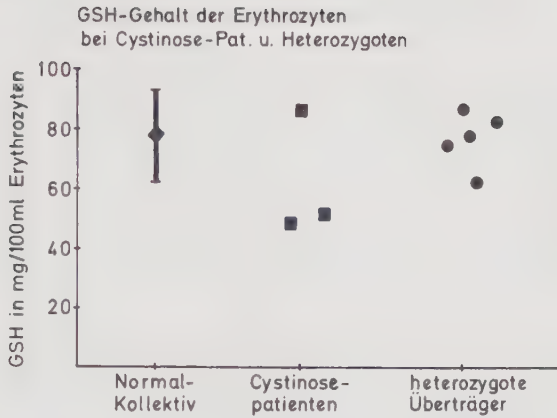


Abb. 11a: GSH-Gehalt der Erythrocyten von Cystinose-patienten und deren Eltern (heterozygote Überträger) in mg/100 ml Erythrocyten im Vergleich mit einem Normalkollektiv

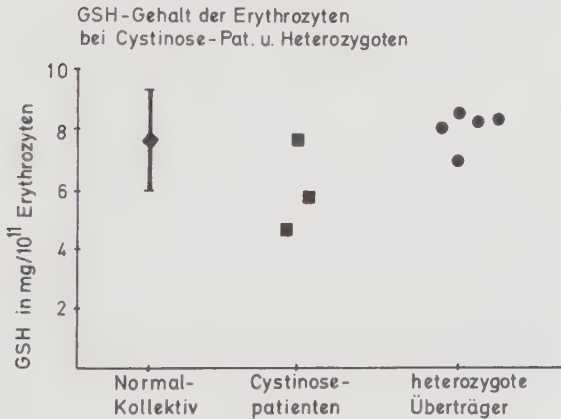


Abb. 11b: GSH-Gehalt der Erythrocyten von Cystinose-patienten und deren Eltern (heterozygote Überträger) in mg/10¹¹ Erythrocyten im Vergleich mit einem Normalkollektiv

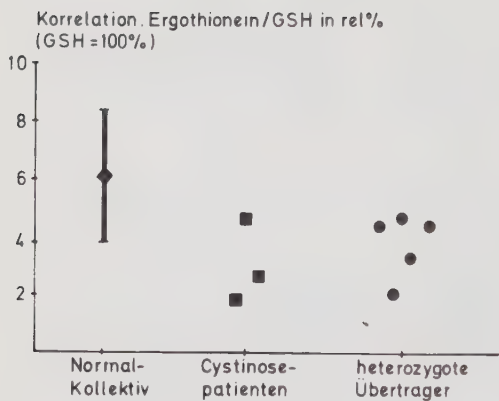


Abb. 12: Relation zwischen dem Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten von Cystinosepatienten und deren Eltern (heterozygote Überträger) in rel% (GSH-Gehalt = 100 %) im Vergleich mit einem Normalkollektiv

4. Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten von Patienten mit chronisch myeloischen und akuten Leukosen

Die Erythrocyten von sieben Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie und sechs Patienten mit akuten Leukosen wurden auf ihren Ergothionein- und GSH-Gehalt untersucht.

Die Ergebnisse sind in Tab. IV und V zusammengefaßt (s. Anhang), in Abb. 13 - 15 werden sie veranschaulicht.

a) Akute Leukosen

Der Ergothioneingehalt der Erythrocyten lag bei drei der von uns untersuchten Patienten in beiden Bezugssystemen (100 ml Erythrocyten und 10^{11} Erythrocyten) im unteren Normbereich, bei zwei unterhalb und nur bei einem oberhalb des Normbereichs (Abb. 13a und 13b). Der Vergleich der Mittelwerte mit den entsprechenden Normalwerten ergibt p-Werte von $\sim 0,15$ bzw. $\sim 0,25$.

Für den GSH-Gehalt der Erythrocyten fanden sich bezogen auf 100 ml Erythrocyten bei vier Patienten, bezogen auf 10^{11} Erythrocyten bei fünf Patienten Werte oberhalb des Normbereichs. Die übrigen Patienten zeigten einen GSH-Gehalt innerhalb der Norm (Abb. 14a und 14b). Der Vergleich des Mittelwertes bezogen auf 100 ml Erythrocyten mit dem entsprechenden Normalwert ergibt $p \sim 0,1$. Wird jedoch der Mittelwert bezogen auf 10^{11} Erythrocyten mit dem entsprechenden Normalwert verglichen, beträgt $p < 0,0125$.

Infolge dieser Erhöhung des GSH-Gehalts der Erythrocyten bei einem Ergothioneingehalt im unteren Normbereich ist die Relation zwischen den beiden Substanzen (angegeben in rel%, GSH = 100 %) bei akuten Leukosen erniedrigt ($p < 0,0125$).

b) Chronische myeloische Leukämie

Der Ergothioneingehalt der Erythrocyten war in beiden Bezugssystemen, 100 ml Erythrocyten und 10^{11} Erythrocyten,

bei einem der Patienten erniedrigt, bei einem erhöht. Die übrigen zeigten Werte im Normbereich (Abb. 13a und 13b). Die berechneten Mittelwerte unterscheiden sich nicht von den entsprechenden Normalwerten ($p \sim 0,25$).

Der GSH-Gehalt war bei zwei (Bezugssystem 100 ml Erythrocyten) bzw. drei (Bezugssystem 10^{11} Erythrocyten) der Patienten erhöht, die übrigen wiesen normale Werte auf (Abb. 14a und 14b). Beim Vergleich dieser Mittelwerte mit den Normalwerten ergeben sich p-Werte von $\sim 0,25$ bzw. $\sim 0,15$.

Ebenso bleibt die Relation zwischen dem Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bei chronischer myeloischer Leukämie innerhalb des Normalbereichs ($p \sim 0,20$) (Abb. 15).

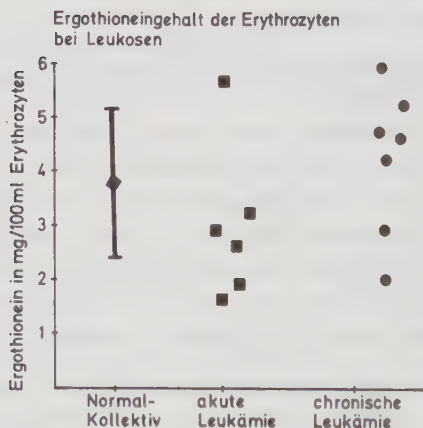


Abb. 13a: Ergothioneingehalt der Erythrocyten bei chronisch myeloischen und akuten Leukosen in mg/100 ml Erythrocyten. Vergleich zum Normalwert.

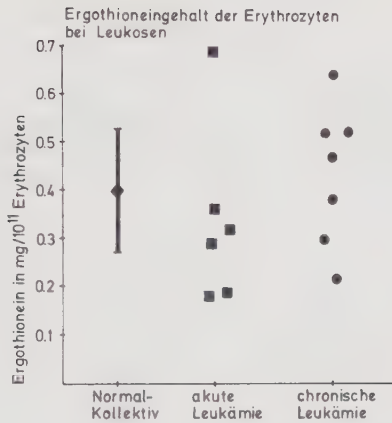


Abb. 13b: Ergothioneingehalt der Erythrocyten bei chronisch myeloischen und akuten Leukosen in $\text{mg}/10^{11}$ Erythrocyten. Vergleich zum Normalwert.

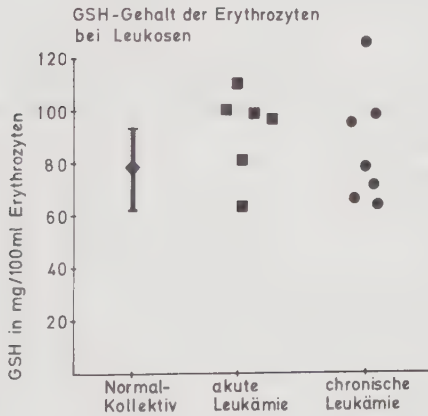


Abb. 14a: GSH-Gehalt der Erythrocyten bei chronisch myeloischen und akuten Leukosen in $\text{mg}/100$ ml Erythrocyten. Vergleich zum Normalwert.

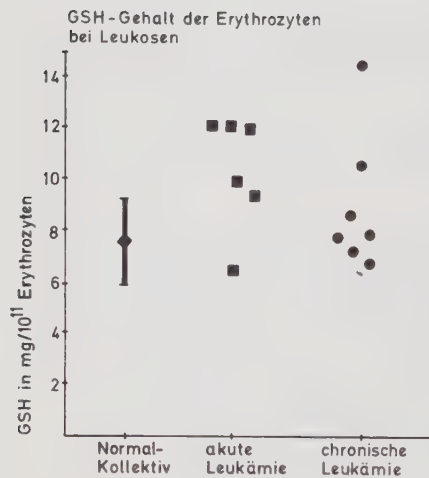


Abb. 14b: GSH-Gehalt der Erythrozyten bei chronisch myeloischen und akuten Leukosen in mg/10¹¹ Erythrocyten im Vergleich zum Normalwert

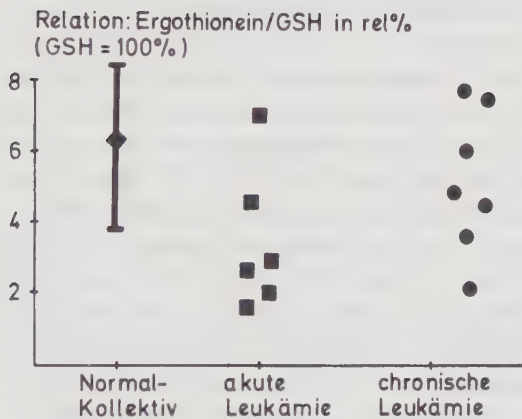


Abb. 15: Relation zwischen dem Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bei chronisch myeloischen und akuten Leukosen in rel% (GSH-Gehalt = 100 %). Vergleich zum Normalwert.

F. Diskussion

1. Nichtproteinäre wasserlösliche Sulfhydrylkomponenten der Erythrocyten bei hereditärer Sphärocytose

In den Mittelpunkt der Pathogenese der hämolytischen Erkrankung bei hereditärer Sphärocytose wird von vielen Autoren die erhöhte passive Permeabilität der Erythrocytenmembran für Natrium gestellt (9a, 62, 65). Jandl diskutiert als deren Ursache eine Verminderung der Anzahl der Thiolgruppen der Erythrocytenmembran, wie sie von Gabor nachgewiesen werden konnte (40, 65). Nach dem u.a. von Passow ausgearbeiteten Membranmodell durchwandern die Ionen die Membran durch mit Ladung besetzte Poren (98). Dabei soll die Permeabilität gegenüber Anionen von positiv geladenen NH_3 -Gruppen abhängig sein; für die Permeabilität gegenüber Kationen scheinen jedoch zusätzlich SH-Gruppen verantwortlich zu sein (107, 120). Die SH-Gruppen der Membranen sollen durch die nichtproteinären, wasserlöslichen Sulfhydrylkomponenten im reduzierten Zustand erhalten werden (97). Die Verminderung der Membransulfhydrylgruppen könnte damit im Zusammenhang mit einer Verminderung der intrazellulären SH-Komponenten stehen.

Loder fand für den GSH-Gehalt der HS-Erythrocyten normale Werte, wählte als Bezugssystem jedoch nur 100 ml Erythrocyten (82). Auch bei den von uns untersuchten Patienten lag der GSH-Gehalt ebenso wie der Ergothionein-Gehalt - bezogen auf 100 ml gepackte Erythrocyten - im Normbereich. Diente die Zellzahl als Bezugssystem, waren jedoch Ergothionein- und GSH-Gehalt erniedrigt. Die Diskrepanz dieser Ergebnisse kann folgendermaßen gedeutet werden: Bei der hereditären Sphärocytose besteht eine Mikrosphärocytose, wobei das Erythrocyteneinzelvolumen annähernd normal oder gering erniedrigt ist (9a). Darüber hinaus stellte Jacob fest, daß die Erythrocyten dieser Patienten schnell schrumpfen, wenn sie nicht in gut gepufferten Suspensionen

und bei niedrigem Hämatokrit inkubiert werden (61). Trotz rascher und sorgfältiger Bearbeitung in gepufferten Lösungen und bei niedrigem Hämatokrit ließen sich diese Schrumpfungsvorgänge wahrscheinlich nicht völlig vermeiden. Als Folge dieser beiden Faktoren - schon normalerweise gering vermindertes Erythrocyteneinzelvolumen und zusätzliche Schrumpfung der Zellen - ist die Zellzahl pro 100 ml Erythrocyten erhöht. Zu berücksichtigen sind damit nur die Ergebnisse, die wir bezogen auf die Zellzahl erhielten. Danach ist der Gehalt der Erythrocyten an GSH und Ergothionein bei der hereditären Sphärocytose vermindert. Die Frage, ob diese Abnahme der intrazellulären, nichtproteinären Sulfhydrylkomponenten Ursache oder Folge der erhöhten passiven Permeabilität für Natrium darstellt, kann aus unseren Ergebnissen nicht beantwortet werden. Im Zusammenhang mit der verminderten Anzahl der Membransulfhydrylgruppen können sie jedoch als ein Hinweis für Beziehungen zwischen den intrazellulären, löslichen und den membrangebundenen Sulfhydrylgruppen gelten.

2. Auswirkung des Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangels auf den Ergothioneingehalt der Erythrocyten

Die hämolytische Erkrankung bei G-6-PDH-Mangel ist ursächlich durch die verminderte Bereitstellung an NADPH bedingt. Dies hat zur Folge, daß der normalerweise vorhandene hohe Reduktionsgrad der nichtproteinären SH-Komponenten nicht aufrechterhalten werden kann. Bisher war allerdings nur bekannt, daß dadurch der Gehalt an Glutathion vermindert ist (13). Wir konnten zeigen, daß das Ergothionein denselben Veränderungen unterworfen ist. Dabei war bei den von uns untersuchten Patienten der Ergothioneingehalt noch stärker als der GSH-Gehalt vermindert.

Da dieser Enzymmangel in Deutschland sehr selten ist, konnten wir unsere Untersuchungen allerdings lediglich bei zwei hemizygoten Patienten (Vater und Sohn) und einer heterozygoten Genträgerin (Mutter) aus einer Gastarbeiterfamilie aus Sardinien durchführen. Infolge des X-chromosomalen Erbganges dieses Enzymmangels ist die gleichzeitige Erkrankung von Vater und Sohn rein zufällig, in Sardinien allerdings nicht selten, da dort bis zu 30 % der männlichen Bevölkerung an diesem Enzymmangel leiden. Die Mutter dieser Familie stellt aufgrund des Erbganges eine heterozygote Genträgerin dar und besitzt damit zwei Erythrocytenpopulationen, wovon eine den G-6-PDH-Mangel aufweist (15). Leider konnten die Töchter dieser Familie nicht untersucht werden (befinden sich noch in Sardinien), die nach dem Erbgang zu 50 % homozygote Genträgerinnen darstellen würden.

Bei Untersuchungen über den Ergothioneingehalt in Retikuloocyten und alternden Zellen konnte eine Abnahme des Ergothioneingehalts mit zunehmender Alterung der Zellen festgestellt werden (39). Neben anderen biochemischen Veränderungen nimmt auch die G-6-PDH-Aktivität der alternden Erythrocyten ab (86).

Das analoge Verhalten des Ergothioneinspiegels sowohl bei Alterung der Zellen mit abnehmender G-6-PDH-Aktivität als

auch bei einer primären Aktivitätsverminderung dieses Enzyms läßt damit trotz der geringen Zahl unserer Untersuchungen den Schluß zu, daß der Gehalt der Erythrocyten an Ergothionein ebenso wie der GSH-Gehalt von der Reduktionskapazität der Erythrocyten in Form des NADPH abhängig ist.

Leider liegen bisher noch keine Ergebnisse über eine Ergothioneinreduktase vor, die die Reduktion von Ergothioneindisulfid zu Ergothionein katalysiert. Es erscheint nach unseren Ergebnissen jedoch möglich, daß diese ebenso wie die Glutathionreduktase NADPH-abhängig wäre.

Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß es bisher noch keine Methode zur getrennten Bestimmung des Ergothioneins in seiner reduzierten und oxydierten Form gibt. Die gefundene Abnahme des Ergothioneingehalts schließt somit beide Anteile ein.

Bei einer vermehrten Oxydation von GSH zu GSSG steigt der GSSG-Gehalt der Erythrocyten nicht proportional zum GSH-Abfall an, so daß es zu einer Verminderung des Gesamt-Glutathions kommt (122). Beutler konnte dabei einen aktiven Transport von GSSG aus den Erythrocyten nachweisen (16). Dies wird als Schutz der Zellen vor einer Anhäufung von oxydierten Substraten gewertet. Daneben trägt auch die gefundene gemischte Disulfidbildung zwischen Glutathion und Hämoglobin zu dieser Abnahme des Gesamt-Glutathions bei (2). Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch für die Abnahme des Gesamt-Ergothioneins verantwortlich sein.

Ob der Ergothioneinabfall an der hämolytischen Erkrankung bei G-6-PDH-Mangel ursächlich mit beteiligt ist oder nur als ein Indikator der Zellschädigung zu werten ist, kann aus unseren Befunden nicht entschieden werden.

3. Nichtproteinäre, wasserlösliche SH-Komponenten der Erythrocyten bei Cystinose

Die Cystinose ist eine Stoffwechselerkrankung, bei der es aus bisher noch nicht geklärter Ursache zu einer Ablagerung von Cystinkristallen in vielen Organen kommt.

Patrick konnte nachweisen, daß diese Cystinablagerungen Enzyme in Leber und Niere hemmen, für deren Aktivität SH-Gruppen wesentlich sind (100). Unbekannt war bisher, ob sich die Störung im Cystinstoffwechsel auch auf die SH-Gruppen enthaltenden Substanzen, Ergothionein und Glutathion, innerhalb der Erythrocyten auswirkt.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß der Ergothioneingehalt der Erythrocyten bei Patienten mit Cystinose deutlich erniedrigt ist, während der GSH-Gehalt im unteren Normbereich liegt, so daß die Relation zwischen beiden Komponenten ebenfalls erniedrigt ist.

Da die Erythrocyten bei dieser Erkrankung keine Cystinkristallablagerungen aufweisen, kann die Ursache der gefundenen Abnahme des Ergothioneingehalts nicht auf eine Störung im Redoxpotential der Erythrocyten selbst durch die Anhäufung des Disulfides Cystin zurückgeführt werden. Auch die SH-Enzyme der Erythrocyten zeigten bei Untersuchungen Patricks - im Gegensatz zu denen der Leber und Niere - eine normale Aktivität (100). Damit muß die Ursache der Ergothioneinverminderung außerhalb der Erythrocyten gesucht werden. Da bisher der Ort der Ergothioneinsynthese im menschlichen Organismus noch unbekannt ist, ist nicht zu entscheiden, ob die Enzyme dieser Synthese durch Cystinablagerungen in den synthetisierenden Zellen gehemmt werden.

Askari und Melville beschrieben die biochemischen Reaktionen der Ergothioneinsynthese bei *Neurospora crassa* (4): Aus der Vorstufe Hercynin wird dort durch Addition eines Schwefelatoms, das von Cystein geliefert wird, Ergothionein gebildet.

Die von uns untersuchten Patienten standen alle unter einem Therapieversuch mit cystin- und methioninarmer Diät, durch die die Cystinkonzentration im Plasma deutlich vermindert wird (30).

Wenn beim Menschen ein ähnlicher Syntheseweg wie bei *Neurospora crassa* vorhanden wäre, könnte man vermuten, daß durch den Therapieversuch das Cysteinangebot für die Ergothioneinsynthese zu gering sei. Eine ähnliche Beeinflussung durch niedrige Cystinzufuhr wurde schon für den GSH-Gehalt der Erythrocyten bei Ratten nachgewiesen (8).

Es bleibt somit offen, ob der Ergothioneingehalt der Erythrocyten bei der Cystinose infolge der zugrunde liegenden Stoffwechselstörung erniedrigt ist oder der von uns gefundene Abfall nur therapiebedingt ist. Gegen letzteres spricht allerdings der noch normale GSH-Gehalt der Erythrocyten bei Cystinose, da zur Synthese des Glutathions ebenfalls Cystein erforderlich ist, weiterhin die Erniedrigung der Relation zwischen dem Ergothionein- und GSH-Gehalt auch bei den heterozygoten Genträgern, die dieser Therapie nicht unterzogen waren.

4. Ergothionein- und GSH-Gehalt der Erythrocyten bei Leukosen

Dem GSH wurde bereits einige Jahre nach seiner Entdeckung eine wichtige Rolle bei der Mitoseregulation und Carcinogenese zugeschrieben, die jedoch bis heute hypothetisch ist (45, 50, 86, 121). Im allgemeinen besteht kein konstantes Verhalten des GSH-Spiegels in Tumorzellen. In den Leukocyten und Erythrocyten von Patienten mit Leukämien wurden von mehreren Autoren Veränderungen des Gehalts an nichtproteinären, wasserlöslichen SH-Komponenten gefunden, die meist auf das GSH bezogen wurden (27, 43, 46, 47, 109).^a Unbekannt war bisher, ob diese Veränderungen auch den Ergothioneingehalt der Zellen betreffen.

Wir fanden in den Erythrocyten der Patienten mit akuten Leukosen eine Erhöhung des GSH-Gehalts der Einzelzelle. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Contopoulos und Anderson (27) und Sabine (109), die sowohl in den Erythrocyten als auch Leukocyten bei akuten Leukämien erhöhte Spiegel nachweisen konnten. Sabine diskutiert dabei, daß die gefundene Erhöhung des GSH-Gehalts durch eine andere Komponente bedingt sein könnte, die ähnliche Reaktionen wie GSH erzeuge. Da mit der von uns verwandten Methode Ergothionein ebenfalls in die Messung mit eingeht, wurde gleichzeitig das Ergothionein separat bestimmt. Es zeigte sich, daß der Ergothioneingehalt sogar im unteren Normbereich lag, so daß die Erhöhung der nichtproteinären SH-Gruppen nicht durch eine Ergothioneinerhöhung mit bedingt ist.

Drei der von uns untersuchten Patienten standen dabei unter einer Therapie mit Vincristin bzw. Puri-Nethol und Glucocorticoiden. Obwohl einige Autoren von einer kurzzeitigen Senkung des GSH-Gehalts der Erythrocyten durch Glucocorticoide berichten, ist nach einem vergleichenden Literaturstudium von Jocelyn ein Einfluß dieser Medikamente auf den nichtproteinären SH-Gehalt der Erythrocyten unwahrschein-

lich (66). Sowohl für die Höhe des Ergothionein- als auch des GSH-Gehalts konnte kein Zusammenhang mit der Schwere der Anämie, der Leukocytenzahl des peripheren Blutes, dem relativen Anteil an unreifen Vorstufen des peripheren Blutes und der vorausgegangenen Therapie gefunden werden.

Bei chronischer myeloischer Leukämie wurde in Übereinstimmung mit Harrap und Speed (47) ein an der oberen Normgrenze liegender GSH-Gehalt gefunden. Der Ergothioneingehalt blieb im Normbereich. Dabei muß jedoch berücksichtigt werden, daß fünf der von uns untersuchten Patienten unter einer Therapie mit alkylierenden Substanzen standen. Diese führen zu einer Verminderung der Thiolgruppen der Zellen, wobei z.B. Derivate zwischen Myleran und Cystein gefunden wurden (106). So konnten Harrap und Speed eine starke Erniedrigung des GSH-Spiegels in den Leukocyten von Patienten mit chronischer Myelose, die unter einer Mylerantherapie standen, nachweisen, während sie in den Leukocyten der unbehandelten Patienten nur gering erniedrigte Spiegel fanden (47). Da es bisher keinen Anhalt für eine selektive Akkumulation der alkylierenden Substanzen in die Leukocyten gibt, wäre zu vermuten, daß der Gehalt an SH-Komponenten in den Erythrocyten von unbehandelten Patienten erhöht ist. Leider konnten wir nur einen noch unbehandelten Patienten untersuchen. Dieser zeigte allerdings einen normalen GSH- und Ergothioneingehalt. Auch Harrap und Speed konnten keinen Einfluß der Mylerantherapie auf den GSH-Gehalt der Erythrocyten nachweisen (47).

Harrap untersuchte kürzlich den Glutathionstoffwechsel der Leukocyten bei chronischer Myelose: Dabei fand er normale Aktivitäten der GSR und der Enzyme der Glutathionsynthese, die Aktivität der G-6-PDH war erhöht, die der Glutathionperoxydase erniedrigt (49).

Über die Enzyme des Glutathionstoffwechsels der Erythrocyten bei Leukosen liegen jedoch noch keine näheren Untersuchungen vor. Lediglich die Aktivität der GSR und der G-6-PDH der Erythrocyten bei akuten und chronischen Leukämien

wurden von Sabine untersucht (109). Dabei fanden sich keine Abweichungen von der Norm.

Die Erhöhung des GSH-Gehalts der Erythrocyten bei akuten Leukosen kann damit noch nicht befriedigend erklärt werden. Unsere Untersuchungen zeigen jedoch, daß der Stoffwechsel des Ergothioneins innerhalb der Erythrocyten im Gegensatz zu dem des Glutathions bei Leukosen nicht beeinflusst wird.

G. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der Ergothioneingehalt der Erythrocyten von vier Patienten mit hereditärer Sphärocytose, drei Patienten mit Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel, drei Patienten mit Cystinose und fünf ihrer heterozygoten Elternteile, sechs Patienten mit akuten Leukosen und sieben Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie untersucht. Gleichzeitig wurde der GSH-Gehalt bestimmt und die Relation zwischen diesen beiden wasserlöslichen, nichtproteinären SH-Komponenten der Erythrocyten berechnet.

1. Die Erythrocyten der vier Patienten mit hereditärer Sphärocytose wiesen einen normalen Ergothionein- und GSH-Gehalt auf, wenn als Bezugssystem 100 ml Erythrocyten gewählt wurden. Bezogen auf die Zellzahl, war der Gehalt an beiden Substanzen deutlich vermindert. Wir führen diese Unterschiede auf das schon normalerweise gering verminderte Zellvolumen der Erythrocyten bei dieser Erkrankung und die Schrumpfungstendenz dieser Zellen zurück. Im Zusammenhang mit der verminderten Anzahl der Sulfhydrylgruppen der Erythrocytenmembran bei dieser Erkrankung wird die Verminderung des Ergothionein- und GSH-Gehalts als Hinweis für Beziehungen zwischen membrangebundenen und intrazellulären, wasserlöslichen Sulfhydrylgruppen gewertet.

2. In den Erythrocyten der zwei hemizygoten Patienten mit G-6-PDH-Mangel fanden wir eine Erniedrigung des Ergothioneingehalts auf fast die Hälfte der Norm. Eine heterozygote Genträgerin wies einen Gehalt an der unteren Normgrenze auf. Übereinstimmend mit Literaturangaben zeigte der GSH-Gehalt ein analoges Verhalten - erniedrigte Werte bei den Hemizygoten, normale bei den Heterozygoten. Damit ist eine Abhängigkeit des Ergothioneingehalts ähnlich der des GSH-Gehalts von der Reduktionskapazität der Erythrocyten in Form des NADPH zu vermuten.

3. Unsere drei Cystinosepatienten zeigten einen erniedrig-

ten Ergothioneingehalt der Erythrocyten bei normalem GSH-Gehalt. Als mögliche Ursache wird ein zu geringes Cystinangebot für die Ergothioneinsynthese durch den bei diesen Kindern durchgeführten Therapieversuch mit cystin- und methioninarmer Kost diskutiert. Bei den heterozygoten Eltern dieser Kinder, die sämtlich klinisch gesund waren, so daß Therapieeinflüsse ausscheiden, war der Ergothioneingehalt der Erythrocyten normal. Erniedrigt war bei ihnen jedoch die Relation zwischen dem Ergothionein- und GSH-Gehalt. Damit ist auch eine direkte Störung des Ergothioneinstoffwechsels durch die Cystinstoffwechselstörung bei dieser Erkrankung zu diskutieren.

4. Bei den sieben Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie fanden wir einen normalen Ergothioneingehalt der Erythrocyten, bei den sechs Patienten mit akuten Leukosen lag er im unteren Normbereich. Der GSH-Gehalt war bei den akuten Leukosen erhöht, bei der chronisch myeloischen Leukämie im oberen Normbereich. Dabei muß ein eventueller spiegel-senkender Einfluß der Therapie mit alkylierenden Substanzen berücksichtigt werden, die bei fünf der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie durchgeführt wurde. Die Ursache der Erhöhung des GSH-Gehalts bei den akuten Leukosen bleibt unklar. Die zugrunde liegende Erkrankung scheint jedoch nur die eine der beiden wasserlöslichen SH-Komponenten, GSH, zu beeinflussen. Der Stoffwechsel von Ergothionein bleibt unbeeinträchtigt.

Pat.	Ergothionein in mg/100 ml Erythrocyten	Ergothionein in mg/10 ¹¹ Erythrocyten	GSH in mg/100 ml Erythrocyten	GSH in mg/10 ¹¹ Erythrocyten	Ergothionein-/GSH- Gehalt in rel% (GSH = 100 %)
M.F.	5,2	0,35	83,1	5,6	6,3
Y.F.	4,5	0,33	76,2	5,6	5,9
A.P.	2,7	0,16	90,1	6,2	2,7
Al.P.	2,6	0,19	66,0	4,9	3,9
Mittelwert Patienten	3,8 ± 1,3	0,26 ± 0,10	81,1 ± 13,9	5,6 ± 0,5	4,7 ± 1,7
Mittelwert Normalkollektiv	3,8 ± 1,4 (n=26)	0,40 ± 0,13 (n=23)	78,1 ± 15,4 (n=12)	7,6 ± 1,7 (n=12)	6,1 ± 2,3 (n=12)
stat.Vergleich	P vs N ~ 0,5	P vs N < 0,0125	P vs N ~ 0,5	P vs N < 0,0025	P vs N ~ 0,15

Tab. I: Ergothionein- und GSH-Gehalt sowie deren Verhältnis zueinander in rel% (GSH=100%) in Erythrocyten von Patienten mit hereditärer Sphärocytose (bezogen auf 100 ml Erythrocyten und 10¹¹ Erythrocyten). Statistische Vergleiche mit Normalwerten (39). P = Patienten, N = Normalkollektiv, vs = versus, n = Anzahl der Einzelwerte im Normalkollektiv.

	L.S. (hemizygot)	P.S. (hemizygot)	M.S. (heterozygot)	Normal- kollektiv
Ergothionein in mg/100 ml Erythrocyten	1,9	2,1	3,2	$3,8 \pm 1,4$ (n=26)
Ergothionein in mg/10 ¹¹ Erythrocyten	0,20	0,23	0,28	$0,40 \pm 0,13$ (n=23)
GSH in mg/ 100 ml Ery- throcyten	49,3	52,1	90,2	$78,1 \pm 15,4$ (n=12)
GSH in mg/ 10 ¹¹ Ery- throcyten	5,1	5,7	8,0	$7,6 \pm 1,7$ (n=12)
Ergothionein-/ GSH-Gehalt in rel%(GSH=100%)	3,9	4,0	3,5	$6,1 \pm 2,3$ (n=12)

Tab. II: Ergothionein- und GSH-Gehalt sowie deren Verhältnis zueinander in rel% (GSH-Gehalt = 100 %) in Erythrocyten von zwei Patienten mit G-6-PDH-Mangel und einer heterozygoten Genträgerin (bezogen auf 100 ml Erythrocyten und 10¹¹ Erythrocyten). Normwerte zum Vergleich (39). n = Anzahl der Einzelwerte im Normalkollektiv.

homozygote Patienten	Ergothionein in mg/100 ml Erythrocyten	Ergothionein in mg/10 ¹¹ Erythrocyten	GSH in mg/100 ml Erythrocyten	GSH in mg/10 ¹¹ Erythrocyten	Ergothionein-/GSH-Gehalt in rel% (GSH=100%)
S.F.	2,3	0,22	49,5	4,8	4,6
A.L.	1,4	0,16	52,6	5,9	2,7
A.K.	1,6	0,14	87,0	7,7	1,8
Mittelwert Patienten	1,8 ± 0,5	0,17 ± 0,04	63,0 ± 21,0	6,1 ± 1,5	3,0 ± 1,4
Mittelwert Normalkollektiv	3,8 ± 1,4 (n=26)	0,40 ± 0,13 (n=23)	78,1 ± 15,4 (n=12)	7,6 ± 1,7 (n=12)	6,1 ± 2,3 (n=12)
stat.Vergleich	P vs N<0,0005	P vs N<0,0005	P vs N~0,1	P vs N~0,1	P vs N<0,01
heterozygote Eltern					
V.F.	3,7	0,36	83,6	8,1	4,4
M.F.	3,4	0,37	75,7	8,3	4,5
V.L.	3,7	0,40	78,2	8,5	4,7
M.L.	1,3	0,15	63,4	7,0	2,1
M.K.	2,7	0,27	87,7	8,6	3,1
Mittelwert Heterozygote	3,0 ± 1,0	0,31 ± 0,10	77,7 ± 0,3	8,1 ± 0,6	3,8 ± 1,1
Mittelwert Normalkollektiv	3,8 ± 1,4 (n=26)	0,40 ± 0,13 (n=23)	78,1 ± 15,4 (n=12)	7,6 ± 1,7 (n=12)	6,1 ± 2,3 (n=12)
stat.Vergleich	H vs N~0,1	H vs N~0,1	H vs N~0,5	H vs N~0,2	H vs N<0,01

Tab. III: Ergothionein- und GSH-Gehalt sowie deren Verhältnis zueinander in rel% (GSH=100%) in Erythrocyten von Patienten mit Cystinose und deren Eltern (bezogen auf 100 ml Erythrocyten und 10¹¹ Erythrocyten). Statistische Vergleiche mit Normalwerten (30). P=Patienten, H=Heterozygote, N=Normalkollektiv, vs=versus, n=Anzahl der Einzelwerte im Normalkollektiv.

Pat.	Erythrothionein in mg/100 ml Erythrocyten	Erythrothionein in mg/10 ¹¹ Erythrocyten	GSH in mg/100 ml Erythrocyten	GSH in mg/10 ¹¹ Erythrocyten	Erythrothionein-/ GSH-Gehalt in rel% (GSH=100%)
A.B.	5,9	0,64	78,4	8,6	7,5
B.J.	5,1	0,53	66,8	7,0	7,6
J.G.	4,2	0,47	70,6	7,0	6,0
C.F.	4,7	0,37	98,8	7,8	4,8
D.S.	4,6	0,52	128,4	14,5	3,6
X.F.	2,0	0,30	65,3	6,8	4,4
E.M.	2,0	0,22	95,6	10,5	2,1
Mittelwert Patienten	4,2 ± 1,3	0,44 ± 0,15	86,3 ± 22,0	9,0 ± 2,7	5,1 ± 2,0
Mittelwert Normalkollektiv	3,8 ± 1,4 (n=26)	0,40 ± 0,13 (n=23)	78,1 ± 15,4 (n=12)	7,6 ± 1,7 (n=12)	6,1 ± 2,3 (n=12)
stat. Vergleich	p vs N ~ 0,25	p vs N ~ 0,25	p vs N ~ 0,25	p vs N ~ 0,15	p vs N ~ 0,20

Tab. IV: Erythrothionein- und GSH-Gehalt sowie deren Verhältnis zueinander in rel% (GSH=100%) in Erythrocyten von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie (bezogen auf 100 ml Erythrocyten und 10¹¹ Erythrocyten). Statistische Vergleiche mit den Normalwerten (39). n = Anzahl der Einzelwerte im Normalkollektiv, p = Patienten, N = Normalkollektiv, vs = versus

Pat.	Ergothionein in mg/100 ml Erythrocyten	Ergothionein in mg/10 ¹¹ Erythrocyten	GSH in mg/100 ml Erythrocyten	GSH in mg/10 ¹¹ Erythrocyten	Ergothionein-/ GSH-Gehalt in rel% (GSH=100%)
F.Sch.	1,9	0,18	98,8	9,4	1,9
G.G.	2,6	0,32	97,8	12,1	2,7
G.Go.	1,6	0,19	100,6	12,0	1,6
X.S.	3,2	0,35	109,6	12,1	2,9
R.F.	5,6	0,69	80,4	9,9	7,0
M.M.	2,9	0,29	63,0	6,4	4,5
Mittelwert Patienten	3,0 ± 1,4	0,34 ± 0,19	91,9 ± 16,7	10,3 ± 2,3	3,4 ± 2,0
Mittelwert Normalkollektiv	3,8 ± 1,4 (n=26)	0,40 ± 0,13 (n=23)	78,1 ± 15,4 (n=12)	7,6 ± 1,7 (n=12)	6,1 ± 2,3 (n=12)
stat.Vergleich	P vs N ~ 0,15	P vs N ~ 0,25	P vs N ~ 0,1	P vs N < 0,0125	P vs N < 0,0125

Tab. V: Ergothionein- und GSH-Gehalt sowie deren Verhältnis zueinander in rel% (GSH=100%) in Erythrocyten von Patienten mit akuten Leukosen (bezogen auf 100 ml Erythrocyten und 10¹¹ Erythrocyten). Statistische Vergleiche mit Normalwerten (39). P = Patienten, N = Normalkollektiv, vs = versus, n = Anzahl der Einzelwerte im Normalkollektiv.

Anamnestische Daten und Laborbefunde der untersuchten Patienten:

1. Hereditäre Sphärocytose

Pat. A.P.O. (5 3/12 Jahre): Familienanamnese: Mutter gesund, Vater = Pat. Al.P. (33 Jahre) seit früher Kindheit hämolytische Anämie mit ikterischen Schüben, keine Splenektomie. Schwester des Vaters, Großmutter des Vaters und deren Schwester leiden an derselben Erkrankung. Eigenanamnese: seit 2. Lebensjahr schubweise auftretender Ikterus mit ausgeprägter Anämie auch im Intervall (Hb bei Kontrollen zwischen 7,4 - 8,8 g%), starke Infektanfälligkeit, leichte Ermüdbarkeit. Zum Zeitpunkt unserer Untersuchung: Größe bei 75., Gewicht bei 90. Perzentile, schlechter AZ, Turmschädel mit eingesunkener Nasenwurzel, Splenomegalie. Laborbefunde: Hb 8,8 g%, Erythrocyten $2,72 \text{ Mill/mm}^3$, Hb_E 32 pg, Leukocyten $6700/\text{mm}^3$, Thrombocyten $276000/\text{mm}^3$, Reticulocyten 158 ‰. Diff.Blutbild: Segmentk. 40 rel%, Stabk. 5 rel%, Lymphocyten 54 rel%, Monocyten 1 rel%, zahlreiche Mikrosphärocyten, Anisocytose, Poikilocytose, Polychromasie. Osmotische Resistenz der Erythrocyten: Beginn der Hämolyse bei 0,7 % NaCl, vollständige Hämolyse bei 0,4 % NaCl. Coombstest negativ, Serumbilirubin 2,8 mg% (dir. 0,2, indir. 2,6). Urin: Urobilinogen stark positiv, Bilirubin negativ. Erythrocytenüberlebenszeit: $^{51}\text{Cr T } 1/2$: 10 Tage, Erythrocytenenzymaktivitäten in $U/10^{11}$ Erythrocyten und in % der Norm (6) (in Klammern): G-6-PDH 39,9 U (= 246 %), GSR 15,5 U (= 96,5 %), 6-PGDH 16,0 U (= 100 %), PK 64,7 U (= 208 %), HK 6,4 U (= 164 %), PGM 163 U (= 149 %), TIM 800 U (= 60 %), PGK 610 U (= 101 %).

Pat. M.E.Q. (6 5/12 Jahre): Familienanamnese: Mutter = Pat. Y.E. (28 Jahre) ab 2. Lebensjahr schwere hämolytische Anämie mit ikterischen Schüben, Splenektomie im 5. Lebensjahr, seither klinisch beschwerdefrei. Bruder der Mutter Exit.let. nach interkurrentem Infekt bei schwerer hämoly-

tischer Anämie. 1 Bruder der Pat. schwere hämolytische Krisen, Exit.let. nach Splenektomie mit 2 Jahren. Vater und zwei weitere Geschwister der Pat. gesund. Eigenanamnese: bereits im Neugeborenenalter Anämie, danach mehrfach ikterische Schübe, Bluttransfusionen im Abstand von Wochen bis Monaten erforderlich (Hb bei Kontrollen zwischen 6,4 und 9,1 g%), körperliche und geistige Entwicklung normal, Splenektomie mit 5 1/2 Jahren, seitdem klinisch beschwerdefrei. Laborbefunde: a) vor Splenektomie: Hb 6,4 - 9,1 g%, Erythrocyten 2,48 - 3,23 Mill/mm³, Hb_E 27 - 33 pg, Leukocyten 3800 - 5200/mm³, Thrombocyten 160 000 - 208 000/mm³, Reticulocyten 144 - 256 ‰, Anisocytose, Mikrosphärocyten im peripheren Blutaussstrich, Serumbilirubin 1,9 - 2,9 mg% (vorwiegend indir.), Urin: Urobilinogen stark positiv, Bilirubin negativ. Osmotische Resistenz der Erythrocyten: Beginn der Hämolyse bei 0,56 % NaCl, vollständige Hämolyse bei 0,48 % NaCl. Coombstest negativ, Erythrocytenüberlebenszeit: ⁵¹Cr T 1/2: 8 Tage, Erythrocytenenzymaktivitäten in U/10¹¹ Erythrocyten und in ‰ der Norm (6) (in Klammern): G-6-PDH 28,3 U (= 160 ‰), GSR 5,9 U (= 41 ‰), PGM 124,4 U (= 163 ‰), 6-PGDH 23,5 U (= 193 ‰), PK 42,3 U (= 113 ‰). Hb-Differenzierung: HbA₂: 2,7 ‰, HbF: 1,9 ‰, kein anomales Hb. b) nach Splenektomie (Zeitpunkt unserer Untersuchung): Hb 13,2 g%, Erythrocyten 4,7 Mill/mm³, Hb_E 28 pg, Reticulocyten 14 ‰, Leukocyten 4100/mm³, Thrombocyten 323 000/mm³. Diff.Blutbild: Segmentk. 58 rel%, Stabk. 1 rel%, Lymphocyten 30 rel%, Monocyten 5 rel%, Eosinophile 6 rel%.

2. Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenasemangel

Die zwei Patienten L.S. und P.S. stammen ebenso wie die heterozygote Genträgerin M.S. aus einer italienischen Gastarbeiterfamilie aus Sardinien. Pat. L.S. ist der Vater, M.S. die Mutter und Pat. P.S. der Sohn dieser Familie. Eine Tochter ist klinisch gesund, eine weitere Tochter Ikterus neonatorum prolongatus, Anämie.

Pat. L.S.♂ (30 Jahre): wiederholt hämolytische Krisen mit Anämie und Ikterus nach Chloramphenicol und Penicillin. Aktivität der G-6-PDH: 2,6 U/10¹¹ Erythrocyten (= 14,2 % der Norm (6)).

Pat. P.S.♂ (7 Jahre): Ikterus neonatorum prolongatus, mit 1 Monat Kliniksaufnahme wegen Anämie, zweimal hämolytische Krisen nach Antibiotika (Medikamentenname Fltern unbekannt), bisher normale körperliche und geistige Entwicklung, Leber und Milz nicht vergrößert. Laborbefunde (Zeitpunkt unserer Untersuchung): Hb 10,8 g%, Erythrocyten 3,42 Mill/mm³, Reticulocyten 8 ‰, Anisocytose, Erythrocytenenzymaktivitäten in U/10¹¹ Erythrocyten und in % der Norm (6) (in Klammern): G-6-PDH 1,6 U (= 9,0 ‰), GSR 43 U (= 299 ‰), 6-PGDH 29,5 U (= 242 ‰), PK 119 U (= 318 ‰), TIM 3570 U (= 270 ‰).

M.S.♀ (28 Jahre): heterozygote Genträgerin, klinisch gesund, Aktivität der G-6-PDH: 15,5 U/10¹¹ Erythrocyten (= 85 % der Norm)!

3. Cystinose

Pat. A.K.♀ (7 4/12 Jahre): Familienanamnese: Eltern gesund (Mutter = M.K.), zwei gesunde Geschwister. Eigenanamnese: im 1. Lebensjahr normale körperliche und geistige Entwicklung, mit 1 Jahr Beginn rachitischer Veränderungen trotz regelrechter Rachitisprophylaxe, erstes Laufen mit 2 1/4 Jahren, mit 3 Jahren Größe 11 cm unter 3. Perzentile, X-Beine. Diagnosestellung mit 4 1/2 Jahren: Größe 20 cm, Gewicht 3 kg unter 3. Perzentile, X-Beine, Knicksenkfüße, Gebiß lückenhaft, rückständige Knochenkernentwicklung. Laborwerte: Hb 12,2 g%, Erythrocyten 4,08 Mill/mm³, Reticulocyten 20 ‰, Leukocyten 16 900/mm³. Serumwerte: Na 132 mval/l, K 2,2 mval/l, PO₄ anorg. 1,2 - 2,3 mg%, Ca 5,1 mval/l, Cl 89 mval/l, alk. Phosphatase 12,4 E/l, Ges.Eiw. 6,63 g%, Harnstoff-N 23,7 mg%, Stand. Bikarbonat 27,6 mval/l, pH 7,49, p CO₂ 36,0 mmHg. Urin: Menge 2,5 - 3 l/die, spez. Gew. 1004 - 1012, Glukose: Spur, Proteinurie 0,5 ‰, keine Aminoacidurie. Phenolrotausscheidung: nach

15 min 12,2 %, nach 60 min 20,8 %. Phosphatclearance: 36,2 ml/min/1,73 m². Spaltlampenuntersuchung: typ. Cystinkristalle in Cornea. In Lymphknoten- und Konjunktivabiosiematerial: Ablagerung von reichlich Cystinkristallen.

Keine wesentliche Besserung nach sofortigem Therapieversuch mit methionin- und cystinarmer Kost. Mit 6 Jahren Größe 22 cm, Gewicht 2,8 kg unter 3. Perzentile, Kreatininclearance: 71,5 ml/min/1,73 m², Phosphatclearance: 22 ml/min/1,73 m², Phenolrotausscheidung: nach 15 min 12 %, nach 30 min 18,6 %.

Zum Zeitpunkt unserer Untersuchung: (7 4/12 Jahre) Größe 26 cm, Gewicht 4 kg unter 3. Perzentile, Photophobie, Konjunktivitis, X-Beine, Gebiß lückenhaft und kariös. Laborwerte: Hb 12,8 g%, Erythrocyten 4,78 Mill/mm³, Retikulo-cyten 8 ‰, Leukocyten 8300/mm³. Serumwerte: Na 130 mval/l, K 2,75 mval/l, Ca 5,3 mval/l, PO₄ anorg. 2,2 mg%, alk. Phosphatase 13,6 E/l, Harnstoff-N 12,5 mg%, Kreatinin 1,8 mg%, Ges.Eiw. 7,6 g%. Urin: Menge 3 l/die, spez.Gew. 1002, Glukose: Spur, Proteinurie 0,03 ‰, generalisierte Amino-acidurie. Kreatininclearance: 32 ml/min/1,73 m³, Phenolrotausscheidung: nach 15 min 7,3 %, nach 30 min 14,7 %.

Pat. A.L.O⁷ (2 9/12 Jahre) Familienanamnese: Eltern gesund (Mutter = M.L., Vater = V.L.), eine gesunde Schwester, beide Großmütter Cystinurie, ein Onkel und Großvater (mütterlicherseits) Nierensteine. Eigenanamnese: bis 5. Monat gutes Gedeihen, danach Nahrungsverweigerung, häufiges Erbrechen, Fieberschübe, Gewichtsstillstand, rachitische Veränderungen. Mit 1 Jahr Diagnosestellung durch Nachweis von Cystinkristallen in Cornea und Knochenmark. Keine Besserung durch methionin- und cystinarme Kost und Penicillamintherapie. Bei Aufnahme in hiesiger Klinik mit 17 Monaten: Größe 5 cm, Gewicht 2,7 kg unter 3. Perzentile, stat. Entwicklung verzögert, Sitzgibbus, Schmelzdefekte der Zähne, Epiphysenfugen verbreitert, Corneatrübung. Laborwerte: Hb 11,4 g%, Erythrocyten 3,53 Mill/mm³, Leukocyten 11 800/mm³, Retikulocyten 8 ‰. Serumwerte:

Na 129 mval/l, K 2,8 mval/l, Ca 4,9 mval/l, PO_4 anorg. 1,4 mg%, Cl 9,5 mval/l, alk.Phosphatase 8,0 E/l, Harnstoff-N 34 mg%, Ges.Eiw. 5,5 g%, Stand.Bikarbonat 24,6 mval/l, pH 7,51, p CO_2 26,5 mmHg. Urin: Menge 2 l/die, pH 6,5, spez.Gewicht 1000, minimale Proteinurie, Glukosurie 0,1 %, Phenolrotausscheidung: nach 15 min 9,7 %, nach 30 min 17 %.

Zunächst gute Besserung des klin.Bildes bei Diät (methionin- und cystinbeschränkte Kost) während des 10monatigen Kliniksaufenthalts (Wachstum von 8 cm, Gewichtszunahme von 4,0 kg). Danach bei schlechter Annahme der Diät häufig Erbrechen, fieberhafte Infekte, erneute Gewichtsabnahme.

Zum Zeitpunkt unserer Untersuchung: (2 9/12 Jahre) Größe 16 cm, Gewicht 3,3 kg unter 3. Perzentile, Verzögerung der stat. Entwicklung, Sitzgibbus, Epiphysenfugen verbreitert, Zahnentwicklung normal, Photophobie, Muskulatur hypoton. Laborwerte: Hb 8,3 g%, Erythrocyten 2,38 Mill/mm³. Serumwerte: Na 140 mval/l, K 5,85 mval/l, Ca 5,1 mval/l, Cl 98 mval/l, PO_4 anorg. 2,8 mg%, alk.Phosphatase 6,6 E/l, Ges.Eiw. 6,8 g%, Harnstoff-N 34 mg%, Kreatinin 2 mg%, Stand.Bikarbonat 30,9 mval/l, pH 7,54, p CO_2 36 mmHg. Urin: leichte Proteinurie, Glukosurie 0,25 %. Phenolrotausscheidung: nach 15 min 3,1 %, nach 60 min 8,3 %, Kreatininclearance: 54,5 ml/min/1,73 m².

Pat. S.F. ♀ (8 Jahre) Familienanamnese: Eltern gesund (Mutter = M.F., Vater = V.F.), eine Schwester an Cystinose verstorben. Eigenanamnese: mit 4 Monaten Nahrungsverweigerung, schlechtes Gedeihen, Polydipsie, mit 2 Jahren rachitische Veränderungen. Diagnosestellung durch Nachweis von Cystinkristallablagerungen im Knochenmark.

Bei Aufnahme in hiesiger Klinik mit 2 7/12 Jahren: Größe 2 cm unter 3. Perzentile, Gewicht bei 3. Perzentile, Epiphysenfugen verbreitert, O-Beine, Rosenkranzbildung, geistige Entwicklung normal, deutliche Photophobie. In Kon-

junktiva- und Lymphknotenbiopsiematerial reichlich Cystinkristalle. Laborwerte: Hb 11,1 g%, Erythrocyten 2,8 Mill/mm³, Leukocyten 5600/mm³. Serumwerte: Na 150 mval/l, K 2,2 mval/l, Ca 10,1 mval/l, Cl 102,11 mval/l, PO₄ anorg. 1,61 mg%, alk.Phosphatase 36,1 E/l, Rest-N 21,8 mg%, Ges. Eiw. 6,5 g%. Urin: Menge 2 - 2,5 l/die, spez.Gew. 1010, Proteinurie 0,25 ‰, Glukosurie 0,1 ‰, generalisierte Aminacidurie. Phosphatclearance: 32 ml/min/1,73 m², Phenolrotausscheidung: nach 15 min 5 ‰, nach 60 min 20 ‰.

Zunächst gute Besserung durch Therapieversuch mit methionin- und cystinarmer Kost. Mit 4 7/12 Jahren: Größe bei 10., Gewicht bei 75. Perzentile, keine rachitischen Zeichen mehr nachweisbar. Phenolrotausscheidung: nach 15 min 12,2 ‰, nach 30 min 21,2 ‰. Mit 6 10/12 Jahren: Kreatininclearance: 56,5 ml/min/1,73 m², Phenolrotausscheidung: nach 15 min 14,2 ‰, nach 30 min 24,0 ‰. Phosphatclearance: 15,0 ml/min/1,73 m².

Zum Zeitpunkt unserer Untersuchung (7 11/12 Jahre): Größe 1 cm unter 3., Gewicht bei 10. Perzentile, Verstärkung der Corneatrübung und Photophobie. Laborwerte: Hb 12,7 g%, Erythrocyten 4,41 Mill/mm³, Leukocyten 4900/mm³. Serumwerte: Na 132 mval/l, K 3,4 mval/l, Ca 5,2 mval/l, PO₄ anorg. 3,5 mg%, alk.Phosphatase 17,9 E/l, Ges.Eiw. 5,9 g%, Kreatinin 2,17 mg%, Stand.Bikarbonat 19,6 mval/l, pH 7,5, p CO₂ 26 mmHg. Urin: Menge 2,4 l/die, spez.Gewicht 1009, Proteinurie: Spur, Glukosurie 0,1 ‰. Kreatininclearance: 30 - 44 ml/min/1,73 m², Phenolrotausscheidung: nach 15 min 7,9 ‰, nach 30 min 14,4 ‰, Phosphatclearance: 9,8 ml/min/1,73 m².

4. Leukosen

Die wichtigsten anamnestischen Daten und Laborbefunde der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie und akuten Leukosen sind in Tab. VI zusammengefaßt. Von Pat. X.R. (chronische myeloische Leukämie) und Pat. G.Go. (akute Leukämie) waren außer der gesicherten Diagnose zum Zeitpunkt unserer Arbeit die Einzelunterlagen nicht verfügbar.

Patient	A.B. (♂)		R.J. (♂)		C.F. (♀)	
Alter	47 Jahre		50 Jahre		47 Jahre	
Diagnose	Chronische myeloische Leukämie					
bekannt seit	3 Monaten		2 5/12 Jahren		4 Monaten	
Befund	A	B	A	B	A	B
Hb (g%)	6,1	6,1	12,8	6,6	9,6	12,9
Ery. (Mill/mm ³)	2,1	1,9	4,3	2,2	3,3	4,1
Retik. (‰)	1	1	11	2	18	14
Thromb. (/mm ³)	194000	358000	186000	18000	800000	450000
Leukoz. (")	54 000	16 000	184500	2400	80 500	26 500
Lymph. (")	7	8	4	18	4	10
Segm.k. (")	31	8	31	33	35	59
Stabk. (")	24	22	14	29	10	7
Baso. (")	-	4	-	2	4	5
Eosin. (")	-	3	-	-	3	-
Monoc. (")	1	1	2	-	-	-
Metamyel. (")	-	16	13	10	8	8
Myeloc. (")	22	34	31	6	11	7
Promyel. (")	15	2	5	-	6	4
Myelobl. (")	-	2	1	-	19	-
Besonderheiten	-	-	-	-	-	-
Hepatomegalie	+	-	+	+	+	+
Splenomegalie	+	+	+	-	+	+
Lymphome	-	-	+	-	-	-
Hautblutungen	-	-	-	+	-	-
spez. Therapie	Myleran		Myleran		Myleran	

Tab. VI: Anamnestische Daten und Laborbefunde der von uns untersuchten Patienten mit chronisch myeloischen und akuten Leukosen. Befund A wurde zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, Befund B zum Zeitpunkt unserer Untersuchung erhoben.

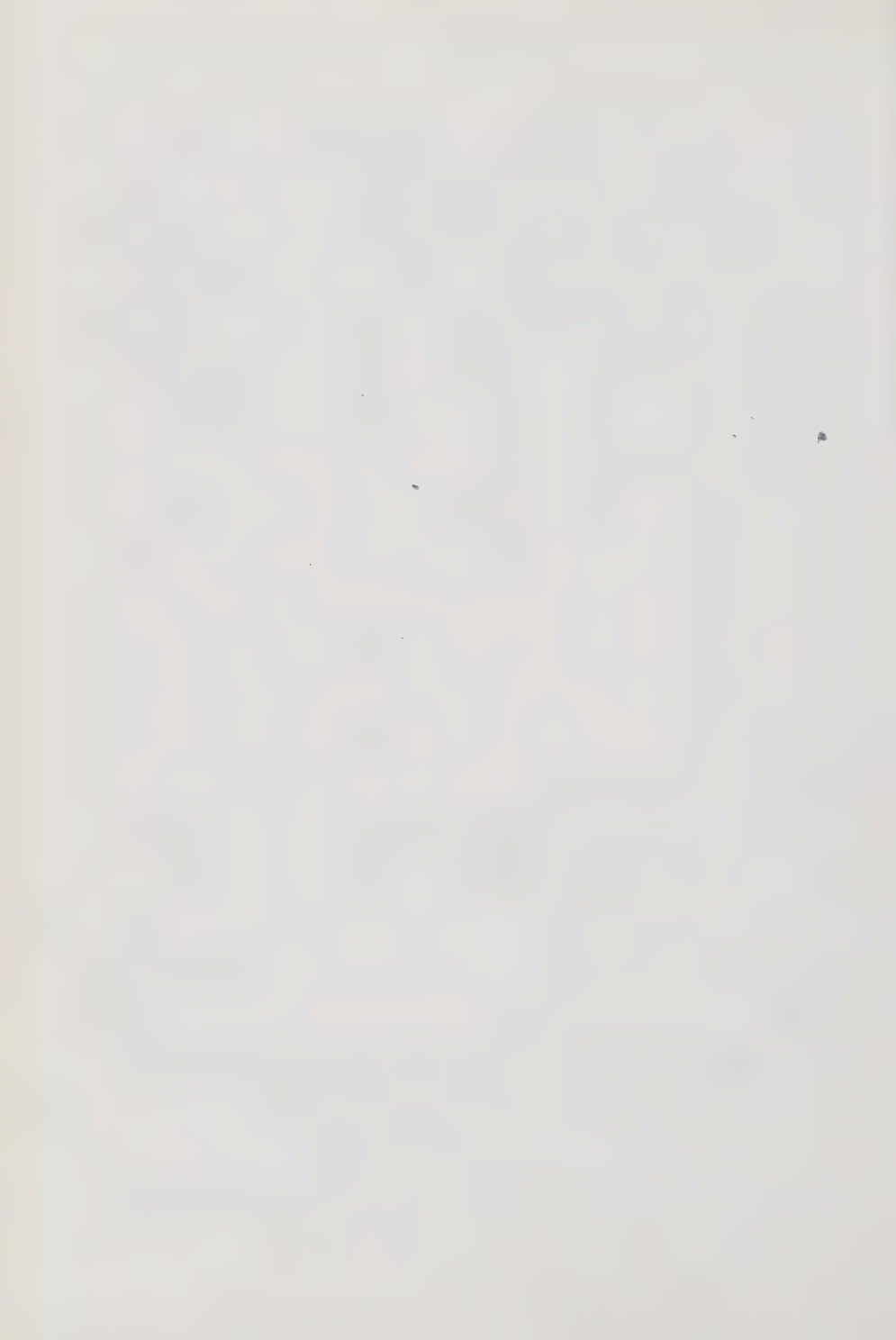
Patient	E.M. (♂)		I.G. (♂)		P.S. (♂)	
Alter	67 Jahre		70 Jahre		56 Jahre	
Diagnose	Chronische myeloische Leukämie					
bekannt seit	1 Monat		1 Jahr		8 7/12 Jahren	
Befund	A	B	A	B	A	B
Hb (g%)	9	10,6	8,3	6,5		11,6
Ery. (Mill/mm ³)	4,11	3,83	2,41	2,0		3,5
Retik. (‰)	13	14	8	7	46	12
Thromb. (/mm ³)	23 000	22 000	130000	56 000	206000	120000
Leukoz. (")	31 000	8 000	22 000	22 000	131000	9 800
Lymph. (")	4	5	13	22		-
Segm.k. (")	31	56	23	24	übrige	41
Stabk. (")	8	13	-	16	Werte	18
Baso. (")	1	-	2	-		-
Eosin. (")	2	-	1	-	nicht	-
Monoc. (")	-	-	-	2	mehr	-
Metamyel. (")	4	4	-	11	auf-	17
Myeloc. (")	10	5	48	18		19
Promyel. (")	-	-	10	1	find-	2
Myelobl. (")	-	1	3	5	bar	3
Besonderheiten	40mye- 26mye- locy- locy- täre Z.täre Z.					
Hepatomegalie	+	+	+	+	+	+
Splenomegalie	+	+	-	+	+	+
Lymphome	+	+	-	-	-	-
Hautblutungen	+	+	-	-	-	-
spez. Therapie	Myleran		-		Myleran	

Fortsetzung Tab. VI

Patient	R.F. (♀)		E.Sch. (♀)	
Alter	41 Jahre		49 Jahre	
Diagnose	Akute myeloische Leukose		Akute Leukose (nicht klassifizierbar)	
bekannt seit	3 Monaten		1 Monat	
<u>Befund</u>	A	B	A	B
Hb (g%)	8,9	8,8	7,6	11,5
Ery. (Mill/mm ³)	3,0	2,7	2,3	3,05
Retik. (‰)	60-100	35	0	5
Thromb. (/mm ³)	15 000		183 000	201 000
Leukoz. (")	7 400	2 700	500	6 000
Lymph. (")	14	60	-	27
Segm.k. (")	10	25	3	59
Stabk. (")	-	14	-	3
Baso. (")	-	-	-	1
Eosin. (")	unreif 1	-	-	-
Monoc. (")	reif 2	-	-	-
Metamyel. (")	-	-	-	-
Myeloc. (")	1	1	-	-
Promyel. (")	unreif 3	-	-	-
Myelobl. (")	reif 1	-	-	-
	1	-	-	-
	56	-	-	-
Besonderheiten	Mikromyelo- blast. 22	fragl. blastä- re Zel- len 2	Lymphoid- zellen 97 (v.a. Blasten)	
Hepatomegalie	+	+	-	-
Splenomegalie	+	+	-	-
Lymphome	-	-	-	-
Hautblutungen	-	-	-	-
spez. Therapie	Puri-Nethol Decortin-H		Vincristin Solu-Decortin-H	

Fortsetzung Tab. VI

Patient	G.G. (♀)		X.S. (♀)	M.M. (♂)
Alter	41 Jahre		27 Jahre	4 Jahre
Diagnose	Akute Lymphoblastenleukose		Akute Leukose	Akute Paraleukoblastenleukose
bekannt seit	1 Monat		1 Tag	1 Tag
<u>Befund</u>	A	B	A = B	A = B
Hb (g%)	6,4	9,0	11,4	7,1
Ery. (Mill/mm ³)	1,48	3,07	3,14	2,04
Retik. (‰)	5	6	7	1
Thromb. (/mm ³)	750 000	87 000	94 000	14 000
Leukoz. (")	46 000	33 000	17 000	46 800
Lymph. (")	-	15	44	29
Segm.k. (")	16	2	19	2
Stabk. (")	1	1	2	-
Baso. (")	2	-	2	-
Eosin. (")	-	-	1	-
Monoc. (")	-	-	-	2
Metamyel. (")	-	-	-	-
Myeloc. (")	-	-	-	-
Promyel. (")	-	-	-	-
Myelobl. (")	-	-	-	-
Besonderheiten	Lymphoblasten 81	Lymphoblasten 82	Blasten 32	Parablasten 67
Hepatomegalie	-	-	-	+
Splenomegalie	+	+	+	+
Lymphome	+	+	-	-
Hautblutungen	-	-	-	+
spez. Therapie	Vincristin Solu-Decortin-H		-	-



L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

1. F.Alberhalden: Familiäre Cystindiathese
Z.Physiol.Chemie 38: 557, 1903
2. D.W.Allen, Jandl, J.A.: Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin II Role of thiols in oxidant drug action
J.Clin.Invest. 40: 454, 1961
3. E.Ambs, Jansen, E.: Über die Häufigkeit von Leukämien und verwandten Erkrankungen
Münch.med.Wschr. 112: 1453, 1970
4. A.Askari, Melville, D.B.: The reaction sequence in ergothioneine biosynthesis: hercynine as an intermediate
J.Biol.Chem. 237: 1615, 1962
5. G.Barger, Ewins, A.J.: The constitution of ergothioneine. A betaine related to hisitidine
J.Chem.Soc. 99: 2336, 1911
6. W.Barthelmai: Die Entwicklung der Enzymaktivitäten der Erythrocyten während des kindlichen Lebensalters
Mschr.Kinderhk. 116: 410, 1968
7. W.Barthelmai: Leukocyten als Testobjekt der Cystinose-therapie
Mschr.Kinderhk. 118: 435, 1970
8. P.Batalden, Swaim, W., Lowham, J.T.: Diet induced red cell reduced glutathione deficiency
J.Lab.Clin.Med. 71: 312, 1968
- 9a.H.Begemann: Klinische Hämatologie
G.Thieme Verlag, Stuttgart 1970, S.197
- 9b.H.Begemann: Klinische Hämatologie
G.Thieme Verlag, Stuttgart 1970, S.447
10. St.Benedict, Newton, E., Behre, J.: A new sulfur-containing compound (thiasine) in the blood
J.Biol.Chem. 67: 267, 1926
11. J.F.Bertles: Sodium transport across the surface membrane of red blood cells in hereditary spherocytosis
J.Clin.Invest. 36: 816, 1957
12. E.Beutler, Dern, R.J., Alving, A.S.: The hemolytic effect of primaquine IV The relationship of cell age to hemolysis
J.Lab.Clin.Med. 44: 439, 1954
13. E.Beutler, Dern, R.J., Flanagan, J.C., Alving, A.S.: The hemolytic effect of primaquine VII Biochemical studies of drug-sensitive erythrocytes
J.Lab.Clin.Med. 45: 286, 1955

14. E.Beutler, Duron, O., Kelly, B.M.: Improved method for the determination of blood glutathione
J.Lab.Clin.Med. 61: 882, 1963
15. E.Beutler, Baluda, M.C.: The separation of glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficient erythrocytes from the blood of heterozygotes for glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficiency
Lancet 1: 189, 1964
16. E.Beutler, Srivastava, S.K.: "The efflux of GSSG from human erythrocytes" in: Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten, I. Internationales Symposium, Wien 1968, S.91
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1968
17. H.Bickel, Harris, H., Baor, H., Astley, R.: Cystine storage disease with aminoacidurie and dwarfism (Lignac-Fanconi-disease)
Acta paediat. (Uppsala) 42 suppl. 90: 1, 1952
18. P.Boivin, Galaud, C., Makim, J., Roge, J., Gueronet, N.: Anémie hémolytique avec déficit en glutathion-peroxydase chez un adulte
Enzymol.Biol.Clin. 10: 68, 1968
19. J.S.Booth, Appleman, M.D.: Degradation of ergothioneine by cellfree extracts of *alcaligenes faecalis*
J.Bacteriol. 85: 654, 1963
20. G.J.Brewer, Tarlov, A.R., Kellermeyer, R.W.: The hemolytic effect of primaquine XII Shortened erythrocyte life span in primaquine sensitive male negroes in the absence of drug administration
J.Lab.Clin.Med. 48: 217, 1961
21. M.P.Brigham, Stein, W.H., Moore, St.: The concentrations of cysteine and cystine in human blood plasma
J.Clin.Invest. 39: 1633, 1960
22. E.Burki: Über die Cystinkrankheit im Kindesalter unter besonderer Berücksichtigung des Augenbefundes
Ophthalmol. 101: 257, 1941
23. P.E.Carson, Flanagan, C.L., Ickes, C.L., Alving, A.S.: Enzymatic deficiency in primaquine sensitive erythrocyte
Science 124: 484, 1956
24. A.Chauffard: Pathogenie de l'ictère congenitale de l'adulte
Sem.Med. (Paris) 27: 25, 1907
25. C.Clayton, Patrick, A.D.: Use of dimercaprol or penicillamine in the treatment of cystinosis
Lancet 2: 909, 1961

26. G.Cohen, Hochstein, P.: Generation of hydrogen peroxide in erythrocytes by hemolytic agents
Biochemistry 7: 895, 1964
27. A.N.Contopoulos, Anderson, H.H.: Sulfhydryl content of blood cells in dyscrasias
J.Lab.Clin.Med. 36: 929, 1950
28. W.M.Court Brown, Doll, R.: Adult leukaemia: trends in mortality in relation to aetiology
Brit.med.J. 1959/I: 1063, 1959
29. W.M.Court Brown, Doll, R.: Leukaemia in childhood and young adult life
Brit.med.J. 1961/I: 981, 1961
30. J.C.Crawhall, Lietman, P.S., Schneider, A.J., Seegmiller, J.E.: Cystinosis. Plasma cystine and cysteine concentrations and the effect of D-penicillamine and dietary treatment
Am.J.Med. 44: 330, 1968
31. J.C.Crawhall, Segal, St.: The intracellular cysteine/cystine ratio in kidney cortex
Biochem.J. 99: 19, 1966
32. R.J.Dern, Beutler, E., Alving, A.S.: The hemolytic effect of primaquine II The natural course of the hemolytic anemia and the mechanism of its self limited character
J.Lab.Clin.Med. 44: 171, 1954
33. J.Dunn, Ibsen, K.H., Coe, E.J., Schneider, A.S., Weinstein, J.M.: Erythrocyte carbohydrate metabolism in hereditary spherocytosis
J.Clin.Invest. 42: 1535, 1963
34. B.A.Eagles, Hunter, G.: The isolation from blood of a hitherto unknown substance, and its bearing on present methods for the estimation of uric acid
J.Biol.Chem. 65: 623, 1925
35. L.Edjarn, Phil, A.: On the mode of action of x-ray protective agents I The fixation in vivo of cystamine and cysteamine to proteins
J.Biol.Chem. 223: 341, 1956
36. R.S.Fraser, Edmonton, A.: Blood ergothioneine levels in disease
J.Lab.Clin.Med. 37: 199, 1951
37. R.S.Fraser, Edmonton, A.: Blood ergothioneine levels in diabetes mellitus
J.Lab.Clin.Med. 35: 960, 1950
38. J.F.Fraumeni, Miller, R.W.: Leukemia mortality: downturn rates in the United States
Science 155: 1126, 1967

39. Ch.Fues: Ergothioneingehalt der Erythrocyten in verschiedenen Altersstufen
Dissertation, Med.Fak. Marburg, 1972
40. E.P.Gabor, de Leuw, N.K.M., Löwenstein, L.: Erythrocyte-membrane sulphhydryl groups in hemolytic anemia
Proc. X.th Congress of the International Society of Haematology, Stockholm 1964
41. A.St.Garay: Role of ergothioneine and catalase in infection by ergot fungus (*claviceps purpurea* tal.)
Nature 177: 91, 1956
42. A.Goguel, Cavigneaux, A., Bernard, J.: Les leucemies benzeniques de la region parisienne
Nouv.Rev.franc.Hemat. 7: 465, 1967
43. F.Goswitz, G.R.Lee, Cartwright, G.E., Wintrobe, M.M.: Erythrocyte reduced glutathione, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and 6-phosphogluconic dehydrogenase in patients with myelofibrosis
J.Lab.Clin.Med. 67: 615, 1966
44. Geigy Documenta: "Wissenschaftliche Tabellen" 1960
45. F.S.Hammett: Effect of radium on glutathione and its biological significance
Protoplasma 15: 422, 1932
46. B.Hardin, Valentine, W.N., Folette, J.H., Lawrence, J.S.: Studies of the sulphhydryl content of human leucocytes and erythrocytes
J.Am.Med.Sc. 228: 80, 1953
47. K.R.Harrap, Speed, D.E.M.: Some biochemical aspects of leukaemias: The appearance of a soluble disulphide in the blood in chronic granulocytic leukaemia
Brit.J.Cancer 18: 809, 1964
48. K.R.Harrap: Some aspects of sulphhydryl metabolism in granulocytic leukaemia
Europ.J.Cancer 1: 189, 1965
49. K.R.Harrap, Jackson, R.C.: Some biochemical aspects of leukaemias: leucocyte glutathione metabolism in chronic granulocytic leukaemia
Europ.J.Cancer 5: 61, 1969
50. J.S.Harrington: The sulphhydryl groups and carcinogenesis
Advanc. Cancer Res. 10: 247, 1967
51. E.J.Harris, Pranker, T.A.J.: The rate of sodium extrusion from human erythrocytes
J.Physiol. 121: 470, 1953

52. H.Heath, Rimington, C., Searlec, E., Lawson, A.:
Some effects of administering ergothioneine
to rats
Biochem.J. 50: 530, 1952
53. H.Heath: The metabolism of ³⁵S-labelled 2-thiolhisti-
dine and ergothioneine in the rat
Biochem.J. 54: 689, 1953
54. H.Heath, Tonnies, G.: The preparation and properties
of ergothioneine disulphide
Biochem.J. 68: 204, 1958
55. G.Hunter: A new test for ergothioneine upon which is
based a method for its estimation in simple
solutions and in blood filtrates
Biochem.J. 22: 4, 1928
56. G.Hunter: The determination of ergothioneine in
simple solution and in blood
Can.J.Research. 27: 230, 1949
57. H.S.Jacob, Jandl, J.H.: Effects of sulphhydryl inhi-
bition on red blood cells I. Mechanism of
hemolysis
J.Clin.Invest. 41: 779, 1962
58. H.S.Jacob, Jandl, J.H.: Effects of sulphhydryl inhi-
bition on red blood cells II. Studies in
vivo
J.Clin.Invest. 41: 1514, 1962
59. H.S.Jacob, Jandl, J.H.: Cell membrane permeability
in the pathogenesis of hereditary spherocy-
tosis
J.Clin.Invest. 43: 1704, 1964
60. H.S.Jacob, Karnovsky, M.L.: Concomitant increase of
membrane phosphatide metabolism and sodium
transport in hereditary spherocytosis
J.Clin.Invest. 44: 1062, 1965
61. H.S.Jacob: Disordered red cell membrane physiology
in the pathogenesis of hereditary spherocy-
tosis in "Stoffwechsel und Membranpermeabi-
lität von Erythrocyten und Thrombocyten"
I. Internation. Symposium Wien, 1968
Thieme-Verlag, Stuttgart 1968, S.162
62. H.S.Jacob: Dysfunction of the red blood cell-membrane
in hereditary spherocytosis
J.Brit.Haemat. 14: 99, 1968
63. H.S.Jacob: Mechanismus of heinz-body formation and
attachement to red cell membrane
Sem. in Hemat. 7: 341, 1970
64. E.Jaffe: The reduction of methemoglobin in erythro-
cytes of patients with congenital methemoglo-
binemia, subjects with erythrocyte glucose-
6-phosphate dehydrogenase deficiency and nor-
mal individuals
Blood 21: 561, 1963

65. J.H.Jandl: Leaky red cells
Blood 26: 367, 1965
66. P.C.Jocelyn: The importance of thiol compounds in the causation of disease
Act.Clin.Chim. 3: 401, 1958
67. H.N.Kirkman, Riley, H.J.D.: Congenital, nonspherocytic hemolytic anemia
Am.J.Dis.Child. 102: 313, 1961
68. S.J.Klebanoff: An ergothioneine-dependant oxidation of reduced pyridine nucleotides by methemoglobin and metmyoglobin. Stimulation by thyroxine
Act.Biochim.Biophys. 64: 554, 1962
69. S.J.Klebanoff: An interrelationship between ergothioneine certain phenolic hormones and peroxidase
Act.Biochim.Biophys. 56: 460, 1962
70. A.Koj, Frendo, J.: Effect of thiol compounds on sulfhemoglobin formation
Act.Clin.Chim. 9: 500, 1964
71. N.S.Kosower: Metabolic changes in normal and glucose-6-phosphate-dehydrogenase-deficient erythrocytes induced by acetylphenylhydrazine
J.Clin.Invest. 42: 1025, 1963
72. N.S.Kosower, Song, K.R., Kosower, E.M.: Glutathione IV. Intracellular oxidation and membrane injury
Act.Biochim.Biophys. 192: 23, 1969
73. N.S.Kosower, Song, K.R., Kosower, E.M.: Glutathione III. Biological azoester procedure for oxidation within the normal human erythrocyte
Act.Biochim.Biophys. 192: 15, 1969
74. J.Krimsky, Racker, E.: Glutathione, a prosthetic group of glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase
J.Biol.Chem. 198: 721, 1952
75. A.L.Latner: A colorimetric method for the estimation of ergothioneine in human blood
Biochem.J. 42: 35, 1948
76. G.O.E.Lignac: Derangement of cystine metabolism in children
Nederl.T.Genesk. 68: 2987, 1927
77. A.M.Lilienfeld: Formal discussion of genetic factors in the etiology of cancer; an epidemiologic view
Canc.Res. 25: 1330, 1965
78. F.Linneweh, Schaumlöffel, E., Graul, E.H., Hundehagen, H., Kirsten E. und R., Barthelmai, W.: Über den Cystin-Metabolismus bei der Cystinose
Kli.Wo. 42: 999, 1964

79. F.Linneweh: "Erbliche Stoffwechselkrankheiten" in Lehrbuch d.Kinderheilkunde, hrsg. von Joppich G. G.Fischer Verlag, Stuttgart 1971, S.194
80. F.Linneweh: Möglichkeiten einer diätetischen Beeinflussung der Cystinose Kli.Wo. 42: 663, 1964
81. G.W.Löhr, Waller, H.D.: Eine neue enzymopenische Anämie mit Glutathionreduktasemangel Med.Kli. 57: 1521, 1962
82. P.Loder, Barbarcy, G., De Gruchy, G.C.: Red cell metabolism in hereditary spherocytosis J.Brit.Haemat. 13: 95, 1967
83. T.Mann, Leone E.: Studies on metabolism of semen; ergothioneine as normal constituent of boar seminal plasma; purification and cristallisation; site of formation and function. Biochem.J. 53: 140, 1953
84. H.C.March: Leukaemia in radiologists, ten years later with a review of the pertinent evidence for radiation leukaemia
85. S.R.Mardashev, Pikkat, A.K.: Synthesis and hydrolysis of glutathione in malignant growths Chem.Abstracts 45: 10364, 1951
86. P.A.Marks: Glucose-6-phosphate-dehydrogenase in mature erythrocytes Am.J.Clin.Path. 47: 287, 1967
87. P.A.Marks, Banks, J., Gross, R.T.: Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity Nature 194: 454, 1962
88. D.B.Melville, Horner, W.H., Otken, C.C., Ludwig, M.L.: Studies on origin of ergothioneine in animals J.Biol.Chem. 213: 61, 1955
89. D.B.Melville, Lubschez, R., Horner, W.H.: Tissue ergothioneine J.Biol.Chem. 206: 221, 1954
90. D.B.Melville: Ergothioneine Vit.and Horm. 17: 155, 1959
91. D.B.Melville, Ludwig, M.L., Inamine, E., Rachele, I.R.: Transmethylation in the biosynthesis of ergothioneine J.Biol.Chem. 234: 1195, 1959
92. D.B.Melville, Otken, C.C., Kovalenko, V.: On origin of animal ergothioneine J.Biol.Chem. 216: 325, 1955

93. C.G.Mills: Hemoglobin catabolism 1. Glutathionperoxidase, an erythrocyte enzyme, which protects hemoglobin from oxidative breakdown
J.Biol.Chem. 229: 189, 1957
94. C.G.Mills: The purification and properties of glutathione peroxidase of erythrocytes
J.Biol.Chem. 234: 502, 1959
95. D.N.Mohler, Eby, N.: ATP metabolism in hereditary spherocytosis
Clin.Research, 12: 217, 1964
96. M. Oort, Loos, J.A., Prins, H.K.: Hereditary absence of reduced glutathione in the erythrocytes - a new clinical and biochemical entity?
Vox. Sang. 6: 370, 1961
97. F.A.Oski, Naimann, J.L.: "Haematologic problems in the newborn" Saunders Company (Philadelphia and London) 1966, S.73
98. H.Passow: Passive ion permeability of the erythrocyte membrane
Prog. in Biophys. 19,2: 425, 1968
99. A.D.Patrick: The degradative metabolism of L-cysteine and L-cystine in vitro by liver in cystinosis
Biochem.J. 83: 248, 1962
100. A.D.Patrick: Deficiencies of SH-dependent enzymes in cystinosis
Clin.Science 28: 427, 1965
101. G.B.Philips, Roome, M.S.: Quantitative chromatographic analysis of the phospholipids of abnormal human red blood cells
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 109: 360, 1962
102. C.F.Reed, Swisher, S.N.: Abnormalities of in vitro behavior of structural lipids of the red blood cells from patients with hereditary spherocytosis
J.Clin.Invest. 39: 1019, 1960
103. J.Rietkötter: Entwicklung der Glutathion-Peroxydase vom Foetal- bis zum Erwachsenenalter und ihre Aktivität in jungen und alten Erythrocyten
Med.Inaug.Diss., Marburg 1971
104. R.A.Rifkind, Danon, D.: Heinz body anemia: an ultrastructural study I. Heinz body formation
Blood 25: 885, 1965
105. R.A.Rifkind: Heinz body anemia: an ultrastructural study II. Red cell sequestration and destruction
Blood 26: 433, 1965

106. J.J.Roberts, Warwick, G.P.: Metabolic and chemical studies of "myleran": Formation of 3-hydroxy-tetrahydrothiophene-I,I-dioxide in vivo, and reactions with thiols in vitro
Nature 184,2: 1288, 1959
107. A.Rothstein: Membrane permeability of erythrocyte in: Internationales Symposium Wien 1968 Stoffwechsel und Membranpermeabilität von Erythrocyten und Thrombocyten
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1968, S.407
108. L.R.Ryklan, Schmidt, L.: Oxidation potentials of cystine-cysteine and related systems
Chem.Abstacts 38: 2974, 1944
109. J.C.Sabine: Glutathione concentration and stability in the red blood cells in various disease states and some observations on the mechanism of action of acetylphenylhydrazine
J.Brit.Haem. 10: 477, 1964
110. E.Salvidio, Panmaccinlli, J., Tizianello, A.: G-6-PD deficient states in Sardinians
Proc. IX. Congr.Europ.Soc.Haemat. part II/1, S.707
Lisbon 1963, Karger Basel
111. Z.Sawiniec, Szunilo, T.: Determination of ergothioneine in human erythrocytes
Chem.Abstacts 68: 36615, 1968
112. D.Scheuch, Kahig, C., Ockel, E., Wagenknecht, C., Rapoport, S.M.: Role of glutathione of a self stabilizing chain of SH-enzymes and substrates in the metabolism regulation of erythrocytes
Nature 190: 631, 1961
113. D.Scheuch, Rapoport, S.M.: Intrazelluläre Regulation der Aktivität einiger SH-Enzyme durch Glutathion
Fol.Haem. 78: 349, 1961
114. J.A.Schneider, Rosenbloom, F.M., Bradley, K.H., Seegmiller, J.E.: Increased free cystine content of fibroblasts cultured from patients with cystinosis
Biochim.Biophys.Res.Comm. 29: 527, 1967
115. J.E.Seegmiller, Howell, R.R.: Cystine metabolism in De-Toni-Fanconi syndrome with cystinosis
Clin.Res. 9: 189, 1961
116. J.E.Seegmiller, Friedemann, Th., Harrison, H.E., Wong, V., Schneider, J.A.: Clinical staff conference: cystinosis
Ann. of Int.Med. 68: 883, 1968

117. S.S.Spicer, Wooley, J.G., Kessler, V.: Depletion in rabbit erythrocytes: effect on methemoglobin formation and reversion
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 77: 418, 1951
- 118a. J.B.Stanbury, Wyngaarden, J.B., Fredrickson, D.S.: The metabolic basis of inherited disease
The Blakiston D.Book Company, New York, Toronto, Sydney,
London, second edition 1966, S.1035
- 118b. " " S.1060
- 118c. " " S.1205
119. N.Sternschuss, Vanderhoff, G.A., Jaffe, E.R., London, I.M.: Metabolic changes in normal and glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficient erythrocytes induced by acetyl-phenylhydrazine
J.Clin.Invest. 40: 1083, 1961
120. R.M.A.Sutherland, Rothstein, I.A., Weed, R.J.: Erythrocyte membrane sulfhydryl groups and cationpermeability
J.Cell.Physiol. 69: 185, 1967
121. M.M.Swann: The control of cell division: I. General mechanisms
Cancer Res. 17: 727, 1957
122. A.Szeinberg, Chari-Bitran, A.: Blood glutathione concentration after hemolytic anemia due to vicia faba or sulphonamides
Acta Haemat. 18: 229, 1957
123. A.Szeinberg, Asher, Y., Sheba, C.: Studies on glutathione stability in erythrocytes of cases with past history of favism or sulf-drug-induced hemolysis
Blood 13: 348, 1958
124. M.C.Tanret: Sur une base nouvelle retiree du seigle ergote l'ergothioneine
Compt.Rend. 149: 222, 1909
125. P.Teitel, March, J., Xenakis, A.: Erythrocyte micro-rheology: its dependence on the reduced sulfhydryl groups and hemoglobin integrity
Fol.Haem. 90: 281, 1968
126. O.Touster: Estimation of blood ergothioneine by determination of bromine labile sulfur
J.Biol.Chem. 188: 371, 1951
127. O.Touster, Yarbrow, Ph.D., Nashville, B.A.: The ergothioneine content of human erythrocytes; the effect of age, race, malignancy and pregnancy
J.Lab.Clin.Med. 39: 720, 1952

128. D.Vanlair, Masius, D.: De la microcythemie
Bull.Acad.ray.Med.Belg. 5 ser III: 515, 1871
zit. nach Begemann (9a)
129. J.van Steveninck, Weed, J.R., Rothstein, A.: Localisation of erythrocyte membran sulphhydryl groups essential for glucose transport
J.Gen.Physiol. 48: 617, 1965
130. H.D.Waller, Löhr, G.W., Tabata, M.: Hämolyse und Fehlen von Glukose-6-P-Dehydrogenase in roten Blutzellen (Eine Fermentanomalie der Erythrocyten)
Klin.Wschr. 355: 1022, 1957
131. R.Weed, Berg, G.: Membrane sulphhydryl groups and ATPase
Fed.Proc. 22: 213, 1963
132. J.B.Wolff: Ergothionase from escherichia coli
J.Biol.Chem. 237: 874, 1962
133. G.Wolf, Bergan, J.G., Sunko, D.E.: Metabolism studies with DL-(α -C¹⁴) ergothioneine
Act.Biochim.Biophys. 54: 287, 1961
134. S.S.Zail, Jonbert, S.M.: Starch gel electrophoresis of erythrocyte membranes in hereditary spherocytosis
Brit.J.Haem. 14: 57, 1968

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof.Dr.F.Linneweh für die freundliche Überlassung eines Arbeitsplatzes in seiner Klinik danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr.W.Barthelmai und Dr.med.M.Vetrella für die Überlassung des Themas, ihre wertvollen Ratschläge und ihre Unterstützung bei der Ausführung der Arbeit.

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren
Professoren und Dozenten

in Marburg: Amon, Barthelmai, Bommer, Brück, Buchholz, Dölle,
Exner, Friederich, Ganz, Golenhofen, Goebell, Hamm,
Hardewig, Hensel, Hildebrandt, Hohorst, Hort, Karlson,
Knauff, Koransky, Kühnel, Linneweh, Lübbers, Mann,
Martini, du Mesnil de Rochemont, Petry, Pots, Rohen,
Schiff, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel,
Sekeris, Siegert, Siess, Straub, Strohmeyer, Vogell,
Voss, Willenbockel, Wiegandt, Zilliken

in München Autrum, Bachmann, Brauner, Dane, Faessler, Huisen,
(I. Med. Fak.) Kranz, v. Lanz, Wiberg

in München Bauer, Brachmann, Blömer, Burkhardt, Gössner, Gres-
(II. Med. Fak.) ser, Hallhuber, Hilber, Kressner, Ley, Liebermeister,
Matussek, Maurer, Merte, Oberdorfer, Reiter, Sewe-
ring, Stickl, Struppler

LEBENS LAUF

Am 14.8.1946 wurde ich als Tochter des Oberschulrates Siegfried Graf und dessen Ehefrau Waltraud, geb. Löw, in Mallersdorf/Ndb. geboren. Vom Herbst 1952 - 1956 besuchte ich die Volksschule in Hebramsdorf/Ndb. 1956 trat ich in das Realgymnasium der Ursulinen in Landshut ein und wechselte 1960 auf das Realgymnasium Seligenthal in Landshut über. Dort legte ich im Juli 1965 die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1965/66 begann ich das Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo ich im September 1966 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ablegte. Im Wintersemester 1966/67 wechselte ich an die Universität Marburg und legte dort im Oktober 1968 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach zwei Semestern an der II. Medizinischen Fakultät der Technischen Hochschule München kehrte ich im Wintersemester 1969/70 nach Marburg zurück und schloß dort im Januar 1972 das Studium mit dem Staatsexamen ab.

Nach meiner Eheschließung im März 1972 mit dem Diplom-Chemiker Peter Krommes arbeitete ich vom April 1972 - März 1973 als Medizinalassistentin an der Medizinischen Poliklinik, der Chirurgischen Klinik und dem Anästhesie-Zentrum der Universität Marburg. Im April 1973 wurde mir die Approbation als Ärztin erteilt. Seitdem bin ich an dem Anästhesie-Zentrum der Universität Marburg tätig.

Der experimentelle Teil für die eingereichte Dissertation wurde von Januar 1970 - Dezember 1970 an der Universitäts-Kinderklinik in Marburg durchgeführt.

